



UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE
COMPOSTELA

Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular



CIMA
CENTRO DE
INVESTIGACIÓN
MARIÑAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN
MARIÑAS. XUNTA DE GALICIA

**Optimización del cultivo en criadero de navaja (*Ensis
arcuatus* Jeffreys, 1865), longueirón (*E. siliqua* Linneo, 1758)
y longueirón vello (*Solen marginatus* Pennánt, 1777):
composición bioquímica y de ácidos grasos en los
desarrollos larvarios**

Memoria presentada por:
Fiz da Costa González
Para optar al grado de Doctor

Dirigida por:
Dra. Dorotea Martínez Patiño
Centro de Investigacións Mariñas
Xunta de Galicia

2009

Dorotea Martínez Patiño, Doctora en Biología e Investigadora del Centro de Investigacións Mariñas (Xunta de Galicia),

INFORMA:

Que el trabajo titulado **“Optimización del cultivo en criadero de navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865), longueirón (*E. siliqua* Linneo, 1758) y longueirón vello (*Solen marginatus* Pennánt, 1777): composición bioquímica y de ácidos grasos en los desarrollos larvarios”**, presentado por D. Fiz da Costa González para optar al Título de Doctor en Biología, ha sido realizado bajo mi dirección. Considerándolo finalizado, autorizo su presentación y defensa.

Ribadeo, a 2 de febrero de 2.009

VºB

Fdo. Dra. Dorotea Martínez Patiño
Directora de la Tesis Doctoral

Fdo. Dr. José Luis Sánchez López
Tutor de la Tesis Doctoral

“Las mejores cosas surgen, en general, de los talentos que forman parte de un grupo; toda persona trabaja mejor cuando tiene compañeros que trabajan en la misma actividad, y se somete al estímulo y la sugerencia, la comparación y la emulación.”

Henry James

“Para qué repetir los errores antiguos habiendo tantos errores nuevos que cometer.”

Bertrand Russel

“Nadie puede guardar todo el agua del mar
en un vaso de cristal,
cuantas gotas tienes que dejar caer
hasta ver la marea crecer, ...
... cuantos golpes dan las olas
a lo largo de un día en las rocas,
cuantos peces tienes que pescar
para hacer un desierto del fondo del mar, ...”

“Salir corriendo”, Amaral



*A mis padres, hermana, la Tata, Sonia y Jose.
In memoriam de Pepe.*

Este trabajo ha sido desarrollado en el Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo (CIMA) de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos de la Xunta de Galicia y financiado, en parte, por los siguientes proyectos y ayudas:

- Proyecto de Investigación "Cultivo y Gestión de Solénidos" de la Junta Nacional de Cultivos Marinos (JACUMAR)
- Proyecto de Investigación "Los solénidos comerciales en Galicia tras la catástrofe del Prestige: Efecto del vertido en determinados aspectos biológicos". PGIDIT (PGIDIT 03RMA50101PR)
- Proyecto de Investigación "Sustainable HARvesting of *Ensis*" (SHARE-90), de la iniciativa europea Interreg IIIB "Atlantic Area"
- Proyecto de Investigación "Towards Integrated Management of *Ensis* stocks" (TIMES), de la iniciativa europea Interreg IIIB "Atlantic Area"
- Beca para la formación de personal en temas de investigación marina, concedida por la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos de la Xunta de Galicia

Por el momento, parte de este trabajo ha sido publicado en forma de dos artículos científicos y un capítulo en un libro:

- da Costa, F.; Darriba, S. & Martínez-Patiño, D. 2008. Embryonic and larval development of *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) (Bivalvia: Pharidae). *J. Moll. Stud.* 74: 103-109.
- da Costa, F. & Martínez-Patiño, D. 2008. Culture potential of the razor clam *Solen marginatus* (Pennant, 1777). *Aquaculture*. doi: 10.1016/j.aquaculture.2008.11.001
- Martínez-Patiño, D. & da Costa, F. 2008. Cultivo de navaja, longueirón y longueirón vello. pp: 213-221. En: Guerra, A. & Lodeiros, C. (ed). *Navajas y longueirones: biología, pesquerías y cultivo*. Xunta de Galicia, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Santiago de Compostela. (ISBN: 978-84-453-4546-7).

AGRADECIMIENTOS

Aunque quizás suene un poco tópico, esta memoria de tesis ha sido posible gracias a la ayuda y contribución de muchas personas que me han enseñado, facilitado mi labor, ayudado o contribuido en que el día a día fuese más llevadero. También, sé que posiblemente se quede gente en el tintero a la que pido disculpas de antemano. Además de agradecer la ayuda para que esta tesis saliese adelante, me gustaría dar las gracias a otras personas que han contribuido al desarrollo de los proyectos en los que he participado.

A la Dra. Dorotea Martínez, por dirigirme pacientemente y darme la oportunidad de que saliese a la luz este trabajo. Además, por creer en mis aptitudes y contratarme para desarrollar esta labor.

Al Dr. Alejandro Guerra, con el que me inicié en este tema y del que he aprendido mucho.

A Susana, por haberme enseñado con paciencia las técnicas de bioquímica y ácidos grasos, y por la ayuda en la revisión de la parte de ácidos grasos. He disfrutado mucho aprendiendo de ti. A Justa, por mostrarme las técnicas histológicas. A las dos por estar siempre ahí y ser muy buena gente.

A mis compañeros que han aportado su granito a que este trabajo haya salido a la luz. A Alicia y a Félix, por la histología y la ayuda en el criadero mientras realizaba las últimas correcciones; a Ana Cerviño, por hacer de la frase “necesitas ayuda” un estandarte; a Andrea por estar siempre dispuesta a echar una mano; a Ana Cruzado por ayudarnos a todos con el engorroso papeleo y demás cuestiones; a Conchita, por las múltiples revisiones de este texto; a Javi, por el fito; a José María, por el mantenimiento y enseñarme a hacer chapucillas varias; a María José, por la ayuda con la semilla; a Menel, que me ayudó con la bioquímica y con el que aprendí mucho de cultivo y muchas otras cosas; a Mercedes, por el bocadillo y los varios; a Merchi, por el fito de todos estos años; a Viki, por las ayudas varias.

A Diego Rial, por su disposición en el trabajo o para cualquier cosa que haya necesitado. Por la ayuda en los dos años de muestreo de las jaulas. Es un buen amigo, con el que he escuchado mucha música.

A los becarios, fuerza en la sombra que hace mover la investigación. Gracias por su ayuda a Sonia, Diego, Diana, Mari Carmen y Sari.

A la Dra. Susana Darriba, que ha sido un referente en investigación para mí y es una gran amiga. Gracias por tu amistad y la ayuda a lo largo de este tiempo. A Mercedes Miranda, que me animó mucho en los comienzos, enseñándome pacientemente a diseccionar navajas.

A José Luis Catoira por las muestras de longueirón de Fisterra.

Al Dr. Juan Fernández Tajés y Dra. Josefina Méndez, por su amistad, ánimo, cariño y ayuda.

A la Dra. Carmen López, por suministrarnos el fijador y el tampón para la microscopía electrónica.

Al Dr. José Luis Sánchez, por la revisión del capítulo de bioquímica y a la Dra. Manuela Becerra, por revisar el capítulo de embriología y desarrollo larvario.

A Antonio Cerviño, por su alegría y ayuda con las experiencias en batea.

A Alfonso García Pérez de Estadística de la UNED, por la revisión de parte de los métodos estadísticos.

A mis compañeros en los proyectos SHARE y TIMES, con los que ha sido un placer desarrollar las investigaciones: Linn Browne, Rita Constantino, Adele Cromie, Edward Fahy, Juan Fernández, Miguel Gaspar, Niall McDonough, Stuart McWilliams, Josefina Méndez, Dai Roberts y Astrid Werner.

A Suso Méndez e Inés Pazos, del servicio de microscopía electrónica del CACTI-Universidad de Vigo, por la gran labor que han desempeñado con las muestras de MEB.

A las Cofradías de Cangas, Redondela y Fisterra por la ayuda en la obtención de las muestras de navaja, longueirón vello y longueirón, respectivamente.

A la Cofradía de Ribadeo, y en especial a Ramón, Sara y Ana, por su ayuda en distintas experiencias.

A Pedro Ferreiro y a la Cofradía de Aldán, por la colaboración en diversas experiencias con semilla.

A Jacobo López y Carmen Rodríguez del Centro de Experimentación Pesquera CEP-Castropol por la ayuda en parte de los muestreos de las jaulas.

A Juan Carlos Arronte por su gran amistad, apoyo y por los sabios consejos y correcciones en el manuscrito. A mis buenos amigos Buján, Fausto, Isaac, Pichi, Román, Silvia (gracias a ti obtuve mi primera beca de investigación), Juan Carlos, Diego, Jose, Tania, Paco, Alba y Sonia, por apreciar lo que hago, preocuparse siempre por mí y haber estado ahí, incluso en los malos momentos.

A mi "suequita", a la que adoro y que me ha dado siempre ánimos y fuerzas para superarme, creyendo siempre en mis capacidades. Las palabras nunca podrán expresar mi gratitud. A mis gatas, Circe "la futbolista" y Leda "la vigilante".

A mis padres, por haberme dado siempre mucho. Sois un referente para mí en muchos aspectos, me habéis dado una gran educación en valores y en conocimiento. A mi hermana Ádega, con la que siempre he podido contar. A la Tata, por ser una segunda madre y por todo el cariño, dedicación y ricos platos caseros. A mi abuelo Pepe, que ya no está, pero del que aprendí grandes cosas y que me legó mil recuerdos.

A todos, GRACIAS.

Índice

ÍNDICE

| | |
|--|-----------|
| ➤ I. INTRODUCCIÓN GENERAL | 3 |
| I.1.- Clasificación, hábitat y distribución | 3 |
| I.2.- Anatomía | 6 |
| I.3.- Producción | 12 |
| I.3.1.- En Europa | 12 |
| I.3.2.- En España | 13 |
| I.3.3.- En Galicia | 14 |
| I.4.- Planes de explotación y métodos de captura en Galicia | 17 |
| ➤ II. OBJETIVOS | 23 |
| ➤ III. CAPÍTULO I: CULTIVO | 27 |
| III.1.- INTRODUCCIÓN | 27 |
| III.1.1.- Cultivo en criadero | 27 |
| III.1.1.1.- Fases del cultivo de bivalvos | 28 |
| III.1.1.2.- Alimentación: microalgas marinas | 29 |
| III.1.1.3.- Acondicionamiento | 31 |
| III.1.1.4.- Inducción a la puesta | 33 |
| III.1.1.5.- Cultivo larvario | 34 |
| III.1.1.6.- Cultivo postlarvario | 35 |
| III.1.2.- Cultivo en el medio natural | 36 |
| III.1.3.- Objetivos del capítulo | 38 |
| III.2.- MATERIAL Y MÉTODOS | 39 |
| III.2.1.- Cultivo de microalgas | 39 |
| III.2.2.- Recogida de reproductores y traslado al laboratorio | 41 |
| III.2.3.- Acondicionamiento | 41 |
| III.2.3.1.- Sistema de mantenimiento | 41 |
| III.2.3.2.- Procesado e histología | 42 |
| III.2.4.- Inducción a la puesta | 44 |
| III.2.5.- Cultivo larvario | 45 |
| III.2.5.1.- Recogida de muestras y control biométrico | 46 |
| III.2.6.- Cultivo de postlarvas y semilla | 47 |
| III.2.6.1.- Recogida de muestras y control biométrico | 47 |
| III.2.7.- Siembra y cultivo en el medio natural | 48 |
| III.2.7.1.- Control de los parámetros ambientales del medio | 49 |
| III.2.8.- Desoves procedentes del longueirón vello (<i>Solen marginatus</i>) cultivado en jaulas | 50 |
| III.2.9.- Representación de datos y análisis estadístico | 50 |
| III.2.9.1.- Cultivo larvario | 50 |
| III.2.9.2.- Cultivo de postlarvas y semilla | 51 |
| III.3.- RESULTADOS | 52 |
| III.3.1.- Acondicionamiento | 52 |
| III.3.1.1.- Navaja (<i>Ensis arcuatus</i>) | 52 |
| III.3.1.1.1.- 1ª experiencia (desde reposo gonadal) | 52 |
| III.3.1.1.2.- 2ª experiencia (desde inicio de la gametogénesis) | 53 |

| | |
|---|------------|
| III.3.1.1.3.- 3ª experiencia (desde gametogénesis avanzada)..... | 54 |
| III.3.1.2.- Longueirón (<i>Ensis siliqua</i>)..... | 56 |
| III.3.1.2.1.- 1ª experiencia (desde reposo gonadal)..... | 56 |
| III.3.1.2.2.- 2ª experiencia (desde inicio de la gametogénesis)..... | 57 |
| III.3.1.2.3.- 3ª experiencia (desde gametogénesis avanzada)..... | 58 |
| III.3.1.3.- Longueirón vello (<i>Solen marginatus</i>)..... | 60 |
| III.3.1.3.1.- 1ª experiencia (desde reposo gonadal)..... | 60 |
| III.3.1.3.2.- 2ª experiencia (desde gametogénesis avanzada)..... | 61 |
| III.3.2.- Inducción a la puesta..... | 62 |
| III.3.2.1.- Navaja (<i>Ensis arcuatus</i>)..... | 62 |
| III.3.2.2.- Longueirón (<i>Ensis siliqua</i>)..... | 63 |
| III.3.2.3.- Longueirón vello (<i>Solen marginatus</i>)..... | 63 |
| III.3.3.- Cultivo de larvas..... | 63 |
| III.3.3.1.- Navaja (<i>Ensis arcuatus</i>)..... | 63 |
| III.3.3.2.- Longueirón (<i>Ensis siliqua</i>)..... | 68 |
| III.3.3.3.- Longueirón vello (<i>Solen marginatus</i>)..... | 74 |
| III.3.3.4.- Comparativa entre especies..... | 78 |
| III.3.4.- Cultivo de postlarvas y semilla..... | 79 |
| III.3.4.1.- Navaja (<i>Ensis arcuatus</i>)..... | 79 |
| III.3.4.2.- Longueirón (<i>Ensis siliqua</i>)..... | 81 |
| III.3.4.3.- Longueirón vello (<i>Solen marginatus</i>)..... | 84 |
| III.3.4.4.- Comparativa entre especies..... | 87 |
| III.3.5.- Cultivo exterior..... | 88 |
| III.3.5.1.- Crecimiento en el medio del longueirón vello (<i>Solen marginatus</i>) en relación con... los parámetros medioambientales..... | 88 |
| III.3.5.2.- Crecimiento en el medio del longueirón vello (<i>Solen marginatus</i>)..... | 90 |
| III.3.5.3.- Desoves procedentes del longueirón vello (<i>Solen marginatus</i>) cultivado en jaulas..... | 93 |
| III.4.- DISCUSIÓN..... | 95 |
| ➤ IV. CAPÍTULO II: EMBRIOLOGÍA Y DESARROLLO LARVARIO..... | 113 |
| IV.1.- INTRODUCCIÓN..... | 113 |
| IV.2.- MATERIAL Y MÉTODOS..... | 115 |
| IV.2.1.- Obtención de gametos y cultivo larvario..... | 115 |
| IV.2.2.- Procesado para microscopía electrónica de barrido (MEB)..... | 115 |
| IV.3.- RESULTADOS..... | 117 |
| IV.3.1.- Navaja (<i>Ensis arcuatus</i>)..... | 117 |
| IV.3.2.- Longueirón (<i>Ensis siliqua</i>)..... | 125 |
| IV.3.3.- Longueirón vello (<i>Solen marginatus</i>)..... | 133 |
| IV.4.- DISCUSIÓN..... | 138 |
| ➤ V. CAPÍTULO III: BIOQUÍMICA DE LAS LARVAS..... | 145 |
| V.1.- INTRODUCCIÓN..... | 145 |
| V.2.- MATERIAL Y MÉTODOS..... | 149 |
| V.2.1.- Recogida de muestras..... | 149 |
| V.2.2.- Métodos analíticos..... | 150 |
| V.2.2.1.- Determinación y extracción de lípidos totales..... | 150 |

| | |
|--|------------|
| V.2.2.2.- Determinación de proteínas..... | 153 |
| V.2.2.3.- Determinación de glúcidos totales | 155 |
| V.2.3.- Equivalentes energéticos | 156 |
| V.2.4.- Análisis estadístico | 157 |
| V.3.- RESULTADOS | 158 |
| V.3.1.- Composición bioquímica del alimento | 158 |
| V.3.2.- Composición bioquímica de las larvas de navaja (<i>Ensis arcuatus</i>) | 158 |
| V.3.3.- Composición bioquímica de las larvas de longueirón (<i>Ensis siliqua</i>) | 163 |
| V.3.4.- Composición bioquímica de las larvas de longueirón vello (<i>Solen marginatus</i>)..... | 167 |
| V.3.5.- Comparativa entre especies | 170 |
| V.4.- DISCUSIÓN | 174 |
| ➤ VI. CAPÍTULO IV: COMPOSICIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN EL DESARROLLO LARVARIO..... | 191 |
| VI.1.- INTRODUCCIÓN | 191 |
| VI.1.1.- Lípidos y ácidos grasos: definición y clasificación | 191 |
| VI.1.2.- Los ácidos grasos de las microalgas | 196 |
| VI.1.3.- Los ácidos grasos en el cultivo larvario | 196 |
| VI.2.- OBJETIVOS | 199 |
| VI.3.- MATERIAL Y MÉTODOS..... | 200 |
| VI.3.1.- Recogida de muestras y tratamiento..... | 200 |
| VI.3.2.- Análisis de ácidos grasos..... | 200 |
| VI.3.3.- Análisis estadístico..... | 207 |
| VI.4.- RESULTADOS | 208 |
| VI.4.1.- Composición de la mezcla del fitoplancton usada como alimento | 208 |
| VI.4.2.- Comparativa de los estadios larvarios entre especies | 209 |
| VI.4.2.1.- Ovocito | 209 |
| VI.4.2.1.1.- Lípidos neutros | 209 |
| VI.4.2.1.2.- Lípidos polares | 211 |
| VI.4.2.2.- Larva D veliger..... | 213 |
| VI.4.2.2.1.- Lípidos neutros | 213 |
| VI.4.2.2.2.- Lípidos polares | 215 |
| VI.4.2.3.- Pediveliger..... | 217 |
| VI.4.2.3.1.- Lípidos neutros | 217 |
| VI.4.2.3.2.- Lípidos polares | 219 |
| VI.4.2.4.- Postlarva | 221 |
| VI.4.2.4.1.- Lípidos neutros | 221 |
| VI.4.2.4.2.- Lípidos polares | 223 |
| VI.4.3.- Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario de navaja (<i>Ensis arcuatus</i>) | 225 |
| VI.4.3.1.- Lípidos neutros | 225 |
| VI.4.3.2.- Lípidos polares | 229 |
| VI.4.4.- Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario del longueirón (<i>Ensis siliqua</i>)..... | 232 |
| VI.4.4.1.- Lípidos neutros | 232 |
| VI.4.4.2.- Lípidos polares | 236 |
| VI.4.5.- Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario del longueirón vello (<i>Solen. marginatus</i>)..... | 239 |

| | |
|---|------------|
| VI.4.5.1.- Lípidos neutros | 239 |
| VI.4.5.2.- Lípidos polares | 243 |
| VI.4.6.- Comparativa de las evoluciones durante el desarrollo larvario entre especies | 246 |
| VI.4.6.1.- Lípidos neutros | 246 |
| VI.4.6.2.- Lípidos polares | 248 |
| VI.5.- DISCUSIÓN..... | 252 |
| ➤ VII. CONCLUSIONES | 265 |
| ➤ VIII. BIBLIOGRAFÍA | 267 |
| ➤ IX. ANEXOS: PUBLICACIONES..... | 296 |

Abreviaturas

ABREVIATURAS

| | |
|-------------------------|--|
| a | Ano |
| ac | Acrosoma |
| ác. | Ácido |
| ACC | Acetil-CoA carboxilasa |
| ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| AG | Ácidos grasos |
| AGMI | Ácidos grasos monoinsaturados |
| AGNMI | Ácidos grasos no-metilén-interrumpidos |
| AGPI | Ácidos grasos poliinsaturados |
| AGS | Ácidos grasos saturados |
| AGTs | Ácidos grasos totales |
| ANOVA | Test de Análisis de Varianza |
| ARA | Ácido araquidónico |
| a-v | Eje animal-vegetal |
| b | Blastoporo |
| B.I.M. | Board Iascaigh Mhara (Irish Sea Fisheries Board) |
| bl | Blastómero |
| B.M.V.E. | Bajamar Mínima Viva Equinocial |
| bo | Boca |
| br | Branquias |
| C23:0 | Ácido tricosanoico |
| ch | Charnela |
| Cl ₃ CH/MeOH | Cloroformo/metanol |
| cm | Centímetro |
| cp | Corpúsculo polar |
| Co | Cobalto |
| CO ₂ | Dióxido de carbono |
| CoA | Coenzima A |
| CS ₂ | Disulfuro de carbono |
| Cu | Cobre |
| D | Disoconcha |
| D.E. | Desviación estándar |
| DHA | Ácido docosaheptaenoico |
| Dpf | Días post-fertilización |
| e | Esófago |
| E0 | Estadio 0 o reposo sexual |
| EI | Estadio I o gametogénesis inicial |
| EII | Estadio II o gametogénesis avanzada |
| EIII | Estadio III o madurez |
| EIV | Estadio IV o desove |
| EV | Estadio V o post-puesta |
| <i>E. a</i> | <i>Ensis arcuatus</i> |
| ec | Envuelta coriónica |
| EDTA | Ácido etileno diamino tetracético |
| EFAs | Ácidos grasos esenciales |
| EPA | Ácido eicosapentaenoico |
| <i>E. s</i> | <i>Ensis siliqua</i> |
| FAO | Organización para la agricultura y alimentación |

| | |
|----------------------|--|
| FAS | Ácido graso sintetasa |
| F ₃ B | Trifluoruro de boro |
| Fe | Hierro |
| Feb. | Febrero |
| FID | Detector de ionización de llama |
| Fig | Figura |
| Fij | Fijación |
| g | Gramo |
| gc | Glándula de la concha |
| gd | Glándula digestiva |
| Gl | Glúcido |
| go | Gónada |
| h | Hora |
| HDL | Lipoproteína de alta densidad |
| hpf | Horas post-fertilización |
| HPLC | Cromatografía líquida de alta presión |
| HUFA | Ácido graso altamente insaturado |
| Hv | Huevo |
| i | Intestino |
| I.C.G. | Índice de Condición Gonadal |
| I.C.D. | Índice de Condición de la glándula digestiva |
| igc | Invaginación de la glándula de la concha |
| INTECMAR | Instituto Tecnológico para el Control del Medio Marino |
| Jun. | Junio |
| Kcal g ⁻¹ | Kilocalorías por gramo |
| L | Litro |
| L. | Longitud |
| LD | Larva D |
| LN | Lípidos neutros |
| lp | Lóbulo polar |
| Lp | Lípidos |
| LP | Lípidos polares |
| LT | Lípidos totales |
| m | Músculo retractor del velo |
| M | Molar |
| ma | Músculo aductor |
| Mar. | Marzo |
| May. | Mayo |
| MEB | Microscopio electrónico de barrido |
| MeOH | Metanol |
| mg | Miligramo |
| min | Minuto |
| mit | Mitocondria |
| ml | Mililitro |
| mm | Milímetro |
| Mn | Manganeso |
| Mo | Molibdeno |
| MOD | Materia orgánica disuelta |
| M-Q | Milli-Q |
| N | Normal |

| | |
|-----------------------|----------------------------|
| Nº | Número |
| N ₂ | Nitrógeno |
| NaOH | Hidróxido sódico |
| ng | Nanogramo |
| nm | Nanómetro |
| n.s. | No significativo |
| p | Pie |
| P-1 | Puesta número 1 |
| pa | Penacho apical |
| Pedi. | Pediveliger |
| pg | Picogramo |
| pI | Prodisoconcha I |
| pII | Prodisoconcha II |
| pl | Palpos labiales |
| Postl. | Postlarva |
| P.S. | Peso seco |
| pr | Prototroca |
| Pr | Proteína |
| R ² | Coefficiente de regresión |
| ri | Riñón |
| r.p.m. | Revoluciones por minuto |
| SCD | Estearoil-CoA desaturasa |
| sf | Sifones |
| <i>S. m</i> | <i>Solen marginatus</i> |
| st | Estómago |
| Sup | Supervivencia |
| t | Telotroca |
| TOT. | Total |
| u | Umbo |
| UE | Unión Europea |
| UV | Ultravioleta |
| v | Valva |
| ve | Velo |
| Zn | Zinc |
| µg | Microgramo |
| µg ind. ⁻¹ | Microgramo por individuo |
| µg µl ⁻¹ | Microgramos por microlitro |
| µg l ⁻¹ | Microgramos por litro |
| µl | Microlitro |
| µm | Micrómetro |
| ♀ | Hembras |
| ♂ | Machos |
| Ø | Diámetro |
| ω3 | Ácidos grasos Omega 3 |
| ω6 | Ácidos grasos Omega 6 |
| ω7 | Ácidos grasos Omega 7 |
| ω9 | Ácidos grasos Omega 9 |

I. Introducción general

I. INTRODUCCIÓN GENERAL

I.1.- Clasificación, hábitat y distribución

La navaja (*Ensis arcuatus*), el longueirón (*E. siliqua*) y el longueirón vello (*Solen marginatus*) son las tres especies comercialmente importantes en Galicia. Su clasificación es la siguiente:

- PHYLLUM Mollusca
- CLASE Bivalvia
- SUBCLASE Heterodonta
- ORDEN Veneroida
- SUPERFAMILIA Solenoidea
- FAMILIA Pharidae
 - GÉNERO *Ensis*
 - ESPECIE *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865)
Ensis siliqua (Linneo, 1758)
- FAMILIA Solenidae
 - GÉNERO *Solen*
 - ESPECIE *Solen marginatus* (Pennánt, 1777)

Estas especies tienen la concha alargada, equivalva e inequilateral. Están abiertos en la parte anterior y posterior y presentan un ligamento externo. Poseen uno o dos dientes cardinales en cada valva y además, pueden tener un diente lateral. El músculo aductor anterior es alargado y el posterior es pequeño. Presentan un seno paleal.

Ensis arcuatus (Jeffreys, 1865)

Presentan el margen dorsal de la concha casi recto, el margen ventral más curvado, observándose la forma de navaja. Los márgenes anterior y posterior están truncados oblicuamente (Fig. I.1). La valva derecha tiene un diente cardinal y uno lateral alargado posteriormente y la valva izquierda posee dos dientes laterales y dos cardinales. Los dientes laterales llegan a la mitad del ligamento externo y la impresión

del músculo aductor anterior es larga, llegando a ser el doble de la longitud del ligamento.

Vive enterrada en arena y grava, en la zona intermareal baja y en la infralitoral. Se distribuye desde Noruega hasta el sur de España, apareciendo por toda la costa inglesa.



Fig. I.1. Valvas de E. arcuatus; A: cara externa, valva izquierda; B: cara interna y anatomía; p: pie; go: gónada; ma: músculo aductor anterior; ri: riñón; br: branquia; gd: glándula digestiva; sf: sifones.

Ensis siliqua (Linneo, 1758)

Presenta los márgenes dorsal y ventral paralelos, casi rectos (Fig. I.2). Los márgenes anterior y posterior están oblicuamente truncados, con los extremos redondeados. La valva izquierda tiene dos dientes cardinales y dos laterales, y la valva derecha posee un diente cardinal y otro lateral, alargado posteriormente. Los dientes laterales sólo alcanzan un tercio de la longitud del ligamento. La impresión del músculo aductor anterior es más corta que la de *Ensis arcuatus*.

Habita enterrado en fondos de arena en la zona intermareal baja y en la infralitoral. La distribución se extiende de Noruega hasta la costa occidental de Europa,

pasando por toda la costa inglesa. Su límite meridional, en el Mediterráneo y en el norte de África, no está confirmado debido a confusiones con la especie *Ensis minor*.



Fig. I.2. Valvas de *E. siliqua*; A: cara externa, valva izquierda; B: cara interna y anatomía; p: pie; go: gónada; ma: músculo aductor anterior; ri: riñón; br: branquia; gd: glándula digestiva; sf: sifones.

Solen marginatus (Pennánt, 1777)

Presenta los márgenes dorsal y ventral paralelos y rectos, las valvas están oblicuamente truncadas en la parte anterior (Fig. I.3). En el extremo anterior de la concha posee un prominente surco dorso-ventral. No posee dientes laterales, apareciendo un solo diente cardinal en cada valva. Los músculos paleales están fuertemente desarrollados y carece de orificio ventral en el borde del manto.

Se entierra en arena o fango en la parte inferior de la zona intermareal y también en el submareal, en el interior y exterior de las rías. Se distribuye desde Noruega hasta el Mediterráneo y norte de África, apareciendo en Inglaterra tan solo en las costas sudeste y oeste.



Fig. I.3. Valvas de *S. marginatus*; A: cara externa, valva izquierda; B: cara interna y anatomía; p: pie; ma: músculo aductor anterior; ri: riñón; pl: palpos labiales; br: branquia; gd: glándula digestiva; sf: sifones.

I.2.- Anatomía

Los organismos de la superfamilia Solenoidea presentan una forma alargada y aplanada lateralmente. Están protegidos, igual que el resto de bivalvos, por una **concha** que estructuralmente está formada por tres capas superpuestas, de composición mayoritariamente calcárea, segregadas por el manto: capa externa o periostraco, de coloración variable; capa prismática, de aspecto mate; y capa nacarada, de aspecto brillante. En la parte dorsal anterior se sitúa el ligamento, que es externo y alargado. Inmediatamente por debajo está la charnela donde están situados los dientes cardinales y laterales que encajan con los de la otra valva y son un importante carácter taxonómico.

En la parte interior de las valvas se aprecian las impresiones dejadas por los **músculos aductores** que son los responsables del cierre de las valvas. El músculo aductor anterior deja una impresión alargada y estrecha, mientras que la del posterior es pequeña y redondeada.

A lo largo de la concha, sin llegar a los extremos, se encuentra la impresión paleal que dibuja la zona por la que se fija el manto a las valvas. En el extremo posterior presenta forma de C, abierta hacia el extremo de la concha, y recibe el nombre de **seno paleal**.

El **manto** está formado por una lámina de tejido debajo de las valvas, integrado por un epitelio interno y otro externo, con tejido conectivo entre ellos que está atravesado por numerosos senos sanguíneos, nervios y músculos que actúan en la contracción y retracción de los bordes del manto (Graham, 1931). Los bordes del manto se encuentran sellados, dejando sólo tres aberturas que comunican con el exterior, una abertura anterior por la que asoma el pie y otras dos en la parte posterior, por donde asoman el sifón inhalante y el exhalante. Además, *E. arcuatus* y *E. siliqua* presentan una cuarta apertura en la zona media de la parte ventral, con forma elíptica, y rodeada por pequeños tentáculos que se complementan con los del lado opuesto. Bloomer (1903), concluyó que se trata de una porción de la apertura pedal que desarrolló una serie de tentáculos y se distanció de esta porción al fusionarse las paredes y migrar progresivamente hacia una posición más anterior. Así, la ausencia de la cuarta apertura podría ser indicativo de especies menos evolucionadas, como sucede en *S. marginatus*. Parece ser que este orificio tiene una doble función: como vía accesoria de obtención de alimento y como orificio exhalante de agua y materia extraña que llega a la zona de la boca; esta última parece ser una función secundaria.

El **pie** es un órgano fundamental de la anatomía de estas especies. Es grande, alargado y está adaptado a la excavación, lo que les permite al verse amenazados descender rápidamente hasta 30 cm de profundidad en la arena. Posee nervios procedentes del ganglio pedal y músculos que se distribuyen en todas las direcciones en varias capas: (1) capa de musculatura circular, inmediatamente por debajo del epitelio que cubre el pie, (2) capa externa de musculatura longitudinal, (3) capa de músculos oblicuos, (4) capa de músculos dorso-ventrales, (5) capa interna de músculos longitudinales y (6) capa de músculos dorso-ventrales que corren en dirección oblicua (Graham, 1931). En el centro del pie se localiza el seno pedal, una oquedad a la que llega la hemolinfa procedente de la aorta anterior que, en el período de madurez, está ocupado por tejido gonadal. Existen dos músculos retractores del pie, uno anterior y otro posterior, que dejan sendas impresiones en la concha.

La anatomía de este órgano está directamente relacionada con el mecanismo de enterramiento, que describe minuciosamente Drew (1907). Según este autor, los solénidos son muy activos, se entierran con gran facilidad y pueden incluso nadar y saltar lanzándose fuera del sustrato, en un movimiento que este autor denomina “leaping”. El pie penetra en el sedimento con movimientos de empuje dorsales hasta que se ha estirado totalmente. Durante la extensión, la punta del pie permanece pequeña y el diámetro de éste es menor. Cuando se ha extendido totalmente, el extremo distal se hincha formando un puño que le sirve de anclaje; a su vez, se vuelve rígido y aumenta de diámetro mediante la incorporación de una gran cantidad de hemolinfa en el seno pedal. Posteriormente, la contracción de los músculos retractores produce el enterramiento del resto del cuerpo al dirigirse hacia el punto de anclaje. Durante la extensión, las valvas permanecen abiertas permitiendo la apertura de los sifones y del orificio ventral. Justo antes de la contracción rápida del pie, los sifones y el orificio ventral se cierran y permanecen así hasta el final de la contracción. Con ello se consigue que el agua que se encuentra en el interior se descargue por la zona anterior (entre el pie y los músculos que lo rodean), evitando la entrada de fango y favoreciendo el descenso. Los movimientos de natación son posibles mediante la emisión de chorros de agua por la parte anterior, lo que permite el avance en el sentido opuesto.

El **sistema circulatorio** es de gran importancia en el mecanismo de enterramiento. Es abierto como en los demás bivalvos; no existen capilares que lleven la hemolinfa a los tejidos, pero ésta pasa a través de lagunas para acumularse en los senos sanguíneos. El seno pedal es un largo canal, homólogo al seno pedal posterior de otros pelecípodos, se extiende a lo largo del pie y las fibras musculares que lo rodean permiten la apertura para la entrada de la hemolinfa (Bloomer, 1901). El corazón, incluido en la cavidad pericárdica, consta de un ventrículo fusiforme ubicado en la zona media y dos aurículas triangulares laterales. La cavidad pericárdica se localiza en la zona dorsal de las partes blandas, a la altura de la porción proximal del pie. La pared del ventrículo posee prominentes bandas musculares compuestas por fibras musculares lisas y rodea al tramo final del intestino (recto). La pared de las aurículas posee bandas dispersas de fibras musculares lisas.

La cavidad paleal es el espacio situado a ambos lados de las partes blandas, está delimitado por el epitelio interno del manto y comunica con el exterior a través de los

sifones. La cámara branquial es la porción de la cavidad paleal donde se localizan las branquias. Los solénidos poseen dos láminas branquiales (interna y externa) a cada lado de la cámara branquial, compuestas por una hoja ascendente y otra descendente (lamelas); entre éstas existen uniones de tipo conjuntivo (puentes interlamelares). Las lamelas están plisadas y cada pliegue está constituido por un número variable de filamentos branquiales de distintos tipos: filamentos ordinarios y primarios. Los filamentos ordinarios son los que se hallan en la cresta del pliegue y poseen células ciliadas en la zona más distal; los filamentos primarios carecen de cilios y se unen por puentes interfilamentosos, siendo estas uniones las que confieren la impresión de lamelas o láminas al conjunto.

Las branquias se encargan de la selección de partículas que entran por el sifón inhalante y son conducidas hacia los palpos labiales, donde continúa la selección y traslado de nutrientes hacia la boca.

Los palpos labiales se sitúan delante de las branquias y están constituidos por dos pares uno a cada lado de la base del pie. Tienen forma triangular y poseen una superficie lisa y otra rugosa. Las caras rugosas de cada par se encuentran enfrentadas y están incluidas por su parte posterior en las branquias. La base de los palpos labiales forma el surco oral por el que llegan a la boca las partículas en suspensión seleccionadas.

El **sistema digestivo** comienza en la boca, localizada inmediatamente en la base del pie, y rodeada por los palpos labiales, adonde llega el alimento seleccionado y transportado por las corrientes ciliares de las branquias. La boca se continúa en un corto esófago que da paso al estómago, que se encuentra rodeado por los divertículos digestivos. El estómago es irregular y se divide en tres cavidades: porción esofagal, porción cardíaca y porción pilórica, en cuya parte posterior se localiza el saco del estilo que contiene el estilo cristalino, que se forma en cada digestión y es de naturaleza proteica (Bloomer, 1901). El estilo cristalino tiene forma de bastón largo que atraviesa el saco del estilo y el centro del estómago alcanzando la porción cardíaca, donde termina con un extremo en forma de gancho o anzuelo. Participa en la mezcla del alimento y en la digestión extracelular en el estómago, mediante su rotación y la

secreción de enzimas. *S. marginatus* destaca por poseer un estilo cristalino mucho más largo que *E. arcuatus* y *E. siliqua*.

El estómago comunica con el esófago en la parte anterior-ventral, con el saco del estilo en la parte posterior-dorsal y con la glándula digestiva a través de cinco conductos. La glándula digestiva es un órgano voluminoso que se encuentra rodeando al estómago cubriéndolo en su mayor parte. Posee un color marrón-verdoso. *S. marginatus* presenta la glándula digestiva casi totalmente inmersa en la zona de la base del pie, mientras que en *E. arcuatus* y *E. siliqua* sólo una pequeña parte de este órgano se encuentra en esa situación. En la glándula digestiva es donde tiene lugar la digestión intracelular.

En la parte posterior-ventral del estómago nace el intestino medio, que recorre la base del pie rodeando el saco del estilo cristalino elevándose hacia la parte dorsal y continúa con el recto, que atraviesa el pericardio y alcanza el ano, situado en la cámara branquial, en una situación inmediatamente posterior al músculo aductor posterior.

El **sistema nervioso** de los solénidos es similar al de la mayoría de los lamelibranquios, consta de pares de ganglios que emiten nervios que se ramifican y llegan a los distintos puntos del cuerpo (Graham, 1931).

El par de ganglios cerebro-pleurales se encuentra en una posición anterior y lateral a la boca; siendo visibles en el animal vivo como dos manchas amarillentas de aspecto triangular. El par de ganglios viscerales se sitúa inmediatamente por debajo del integumento de la superficie ventral del cuerpo, están muy próximos aparentando un único ganglio, aunque no están verdaderamente unidos. El par de ganglios pedales se encuentra en la parte dorsal de la base del pie, están fusionados en una estructura ovoide. Reciben los conectivos procedentes de los ganglios cerebro-pleurales y emiten cinco gruesos nervios que van a los músculos del pie.

El **sistema excretor** está formado por un par de riñones y las glándulas pericárdicas, que se abren a la cavidad pericárdica. Los productos residuales se acumulan en determinadas células de las glándulas pericárdicas, que periódicamente descargan a la cavidad pericárdica, que las trasladará a los riñones a través de los

canales pericárdicos. Otras células de las glándulas pericárdicas están probablemente involucradas en la filtración hemolinfática como primer paso para la formación de la orina. Los riñones se identifican fácilmente por su color marrón y su ubicación dorsal a la base del pie, por debajo del corazón.

El **sistema reproductor** de los bivalvos consta de gonoductos pares, canales genitales principales y numerosos canales menores que terminan en una red de folículos o alvéolos. No existe dimorfismo sexual y son, en su mayoría, gonocóricos (sexos separados). La gónada forma a menudo una masa que rodea las asas intestinales en la región visceral (Ostreidos y Venéridos), invadiendo también el manto en el caso de los Mytilidos, mientras que en los Pectínidos se individualiza formando un órgano independiente que sobresale de la masa visceral. La formación de gametos en machos (espermatogénesis) y en hembras (ovogénesis) transcurre en los folículos gonadales, sucediéndose una serie de células características de cada fase del proceso y que conducen a la obtención final de los espermatozoides y de los ovocitos maduros, que son expulsados al medio. En el caso de los Solénidos, la gónada se encuentra formando un órgano independiente sobre el músculo aductor anterior cubriendo la glándula digestiva (sólo en *Ensis*), rodeando las asas intestinales e invadiendo el interior del pie en la época de madurez.

A lo largo del ciclo reproductivo se suceden distintos estadios de desarrollo gametogénico que cambian la apariencia macroscópica y microscópica de la gónada. Las tres especies son gonocóricas y presentan un ciclo anual, sincrónico, con una fase de reposo sexual que varía considerablemente según la especie, siendo éste muy largo en *E. siliqua* (verano-otoño) y muy corto en *S. marginatus* (agosto-septiembre), mientras que en *E. arcuatus* tiene una duración intermedia (verano) (Darriba *et al.*, 2004, 2005; Martínez, 2002). La época de puestas también es diferente según la especie, así *E. arcuatus* destaca por su duración, sucediéndose puestas intercaladas de restauraciones durante casi todo el invierno y primavera, mientras que las otras dos especies realizan sus puestas a finales de primavera. La ubicación del tejido gonadal en época de madurez es diferente en los dos géneros, en *Ensis* aparece en el interior del pie, cubre la glándula digestiva y el músculo aductor anterior, mientras que *Solen* sólo se desarrolla en el interior del pie. Otra diferencia es la ausencia de células de reserva en la gónada de *E. arcuatus* y *E. siliqua*, mientras que en *S. marginatus* se han observado

células vesiculares. Otro aspecto que los diferencia, es la coloración de la gónada en época de madurez, siendo blanca en los machos y marrón en las hembras de *S. marginatus*, mientras que las otras dos especies presentan una coloración blanquizca en ambos sexos.

I.3.- Producción

I.3.1.- En Europa

Como se observa en la figura I.4, durante los tres primeros años en los que hay registros, las capturas se mantuvieron siempre por encima de las 800 toneladas, siguiendo un período entre 1984 y 1986 en que hay un descenso muy brusco hasta la casi desaparición de registros. En 1987 comienza una recuperación, y hasta 1994 se mantienen los desembarcos con valores próximos a 1.200 toneladas/año. En los años 1995-1996 los registros alcanzan los máximos para el período estudiado, sucediéndose por años de registros moderados que varían entre 400 y 700 toneladas al año.

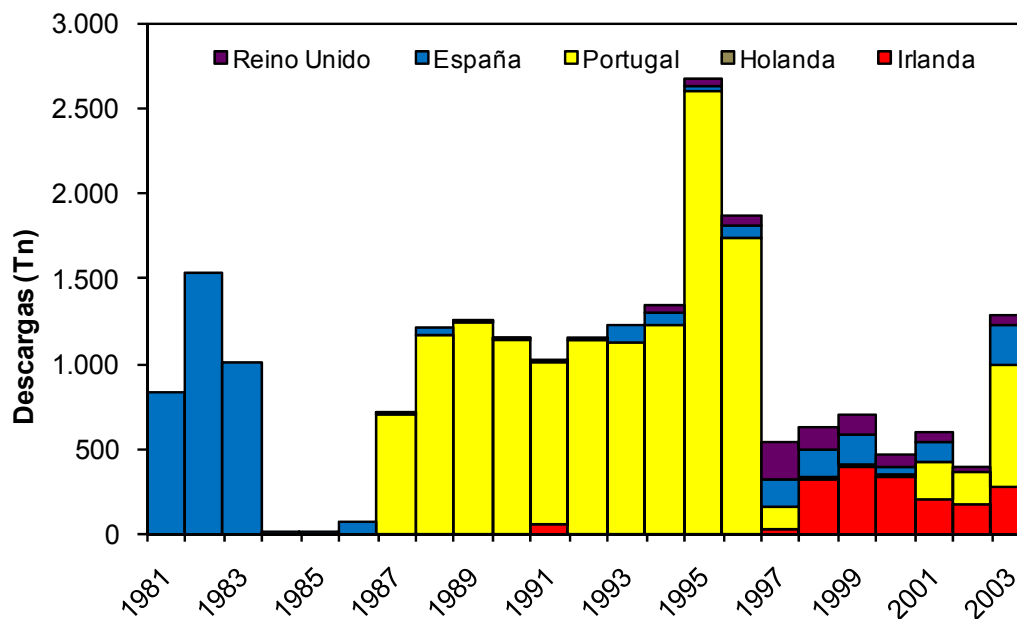


Fig. I.4. Estadísticas de producción de navajas y longueirones en Europa (FAO, 2005).

El análisis por países es bastante distinto al global de capturas. Así, durante los primeros años sólo hay capturas registradas por España, pasando a un segundo plano a partir de 1987. En este año comienzan a registrarse capturas en Portugal e Irlanda, representando el primero más del 90% de las capturas hasta 1997. A partir del siguiente

año es en Irlanda dónde las capturas son más importantes, ganando de nuevo importancia Portugal a partir de 2001.

I.3.2.- En España

Los datos de producciones de navajas y longueirones en España, registrados por los anuarios FAO desde el año 1994, corresponden en su totalidad a capturas realizadas en Galicia, representando en 1998 el 25% de la producción de Europa. La Agencia para el Desarrollo de las Pesquerías en Irlanda (BIM, 2005), con datos referidos al año 2004, señala que el mercado español fue el más importante de la Unión Europea, importando “navajas” de más de 40 países; principalmente y por este orden: Argentina, Italia, Perú, Chile y Francia, lo que supone alrededor del 43% de los solénidos que importa la UE.

Las áreas de distribución de estas especies y su presencia abarca prácticamente todo el litoral español (Tabla I.1), aunque no existen, a excepción del Atlántico noroeste, datos referenciados de producción y capturas que lo avalen.

En Asturias en 2004 se capturaron 2.282 kg de *S. marginatus* a 3,49 €/kg (www.mapa.es/es/pesca/pags/jacumar/planes_nacionales/ultimos_datos_publicados/asturias.htm). La misma fuente cita para el mismo año en Cantabria desembarcos de 3.219 kg de *S. marginatus* a 8,03 €/kg y 1.185 kg a 11,15 €/kg de especies de *Ensis* sin determinar.

Tabla I.1. Zonas del litoral español en que aparecen registros de presencia de navajas y longueirones, en base a los datos del BOE¹.

| | Zona | Especies |
|----------------------|--|---|
| País Vasco | - Ría de Hondarribia - Ría de Mundaca - Ría de Plancia | Navaja (<i>Pharus legumen</i> , <i>Solen marginatus</i> , <i>Ensis ensis</i> y <i>E. siliqua</i>) |
| Cantabria | - Bahía de Santoña - Bahía de Santander - Ría de Mogro - Ría de San Vicente de la Barquera - Ría de Tina Menor | Muergo (<i>Solen</i> spp.) y navaja (<i>Ensis</i> spp.) |
| Asturias | - Ría de Ribadeo - Ría de Villaviciosa | Muergo (<i>Solen marginatus</i>) y <i>E. arcuatus</i> |
| Galicia ² | | No se desglosa por especies |
| Andalucía | - Río Guadiana (desembocadura) - Marismas del Guadiana-Carreras - Río Carreras (desembocadura) - Isla Canela - Barra del Terrón - Marismas del Río Piedras - Río Piedras (desembocadura) - Estuario del Guadalquivir - Río San Pedro y marismas - Saco de la Bahía de Cádiz - Sancti Petri - La Atunera | Longueirón, navaja (<i>Solen</i> spp., <i>Ensis</i> spp.) |
| Cataluña | - Alcanar-Sant Carles de la Ràpita - Costa Sur del Delta del Ebro | Longueirón (<i>Solen marginatus</i>) |
| Islas Baleares | - Costa Sur de Mallorca | Navaja (<i>Solen</i> spp.) |

I.3.3.- En Galicia

La primera especie de solénidos en capturas en Galicia es *E. arcuatus*, como se puede apreciar en la figura I.5. Entre 1993 y 1996 se capturaban en torno a 70 toneladas/año de las tres especies.

Los datos de producción de la especie *E. siliqua* no se corresponden con los citados por Catoira & Traba (1997), ya que estos autores en el año 1996 citan una producción de 48.393 Kg. Esto podría deberse a que, en los datos suministrados por las cofradías, se confunden las especies englobando *E. siliqua* o longueirón, en la producción de navaja o *E. arcuatus* (Martínez, 2002).

A partir de 1997 aumentan las capturas con cifras superiores a 150 toneladas, correspondiendo el 70% a *E. arcuatus*. Este volumen de capturas se ha mantenido hasta

¹ En los anexos de la Orden APA/3228/2005 de 22 de septiembre (BOE, nº 249), se recoge la relación de las zonas de producción de moluscos y otros invertebrados marinos del litoral español.

² En la citada Orden, los datos de Galicia no se encuentran separados por especies.

2002, año en que se produce el accidente del Prestige, y en el que descienden las capturas por cierre de la pesquería durante el final de 2002 y parte del 2003. A partir de 2004, las capturas comienzan a incrementarse año a año, alcanzando 267 toneladas en 2007.

La contribución de cada especie al total es distinta y varía en el tiempo. La especie que representa un mayor porcentaje en las capturas es *E. arcuatus*, siendo su aportación siempre superior al 60%. A partir de 1996 las capturas de esta especie se estabilizan con cantidades superiores a las 100 toneladas, descendiendo en 2002 y 2003 por debajo de esta cifra y aumentando de nuevo paulatinamente a partir de 2004 hasta alcanzar 214 toneladas en 2007.

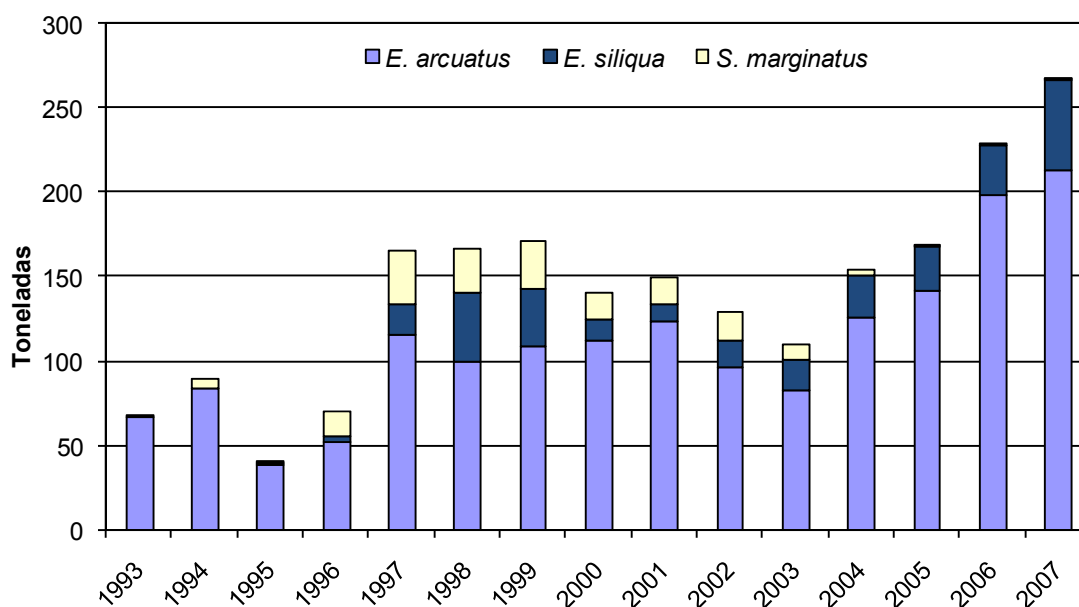


Fig. I.5. Estadísticas de producción de navajas y longueirones en Galicia. Los datos proceden del Servicio de Estadística de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos de la Xunta de Galicia³.

En la actualidad la segunda especie en capturas registradas es *E. siliqua*, con 53 toneladas en 2007. Las capturas registradas de *S. marginatus* aumentaron hasta 1997, año en que se capturaron 31 toneladas, y posteriormente, descienden hasta la práctica desaparición de capturas desde 2005.

³ Datos obtenidos de la Plataforma Tecnológica da Pesca; www.pescadegalicia.com.

En la tabla I.2 se desglosa el origen de la producción, por especies y zonas de capturas, con datos de 2005. En las Rías Bajas (Ría de Vigo, Pontevedra y Arousa), es donde se registran las mayores capturas de navaja y longueirón. Los datos de producción y ventas del longueirón vello se ciñen a las Rías Bajas. En los últimos años se produjo un descenso en la producción de los bancos naturales de *Solen marginatus*, principalmente en las Rías Altas Gallegas, debido a elevadas mortalidades (Martínez, 2002), lo que supuso un descenso en los reclutamientos y en definitiva, en la producción de adultos comerciales. Destacar las subidas en los años 2002 y 2003, motivadas por la escasez de oferta en el mercado, puesto que debido al accidente del Prestige, las zonas de producción estuvieron cerradas durante seis meses a partir de noviembre de 2002.

Tabla I.2. Capturas de navajas y longueirones, vendidos en lonja durante el año 2005, según datos aportados por el Servicio de Estadística de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos de la Xunta de Galicia⁴.

| | <i>E. arcuatus</i> | | <i>E. siliqua</i> | | <i>S. marginatus</i> | | Total | |
|---------------------|--------------------|------------------|-------------------|----------------|----------------------|--------------|----------------|------------------|
| | Kg | € | Kg | € | Kg | € | Kg | € |
| I. Vigo | 46.996 | 700.756 | 2.039 | 27.783 | 281 | 626 | 49.316 | 729.162 |
| II. Pontevedra | 42.996 | 607.478 | 51 | 608 | 302 | 1.590 | 43.349 | 609.676 |
| III. Arousa | 37.390 | 512.132 | 16.155 | 204.013 | 77 | 232 | 53.622 | 716.377 |
| IV. Muros | 3.416 | 34.240 | 2.336 | 22.355 | | | 5.752 | 56.595 |
| V. Finisterre | 11.390 | 107.607 | 2.264 | 21.231 | | | 13.654 | 128.838 |
| VI. Costa da Morte | 36 | 216 | 3.547 | 30.404 | | | 3.583 | 30.620 |
| VII. Mariña lucense | | | 79 | 586 | | | 79 | 586 |
| Total | 142.224 | 1.962.427 | 26.471 | 306.980 | 660 | 2.447 | 169.355 | 2.271.854 |

E. arcuatus es la especie que alcanza un precio medio superior en primera venta, logrando 13,5 €/kg en 2007 (Tabla I.3). *E. siliqua* también posee un alto valor comercial, mientras las cotizaciones de *S. marginatus* no alcanzan los 5 €/Kg en ninguno de los años estudiados.

⁴ Datos obtenidos de la Plataforma Tecnológica da Pesca; www.pescadegalicia.com.

Tabla I.3. Estadísticas de precio medio en €/kg de navajas y longueirones en lonjas de Galicia. Los datos proceden del Servicio de Estadística de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos de la Xunta de Galicia⁵.

| | <i>E. arcuatus</i> | <i>E. siliqua</i> | <i>S. marginatus</i> |
|------|--------------------|-------------------|----------------------|
| 2001 | 11,46 | 8,21 | 3,27 |
| 2002 | 13,37 | 10,48 | 3,48 |
| 2003 | 15,91 | 16,02 | 2,73 |
| 2004 | 14,6 | 12,09 | 4,54 |
| 2005 | 13,8 | 11,57 | 3,71 |
| 2006 | 13,12 | 12,47 | 2,47 |
| 2007 | 13,5 | 11,29 | 4,63 |

I.4.- Planes de explotación y métodos de captura en Galicia

Dado el interés que tiene para Galicia el aprovechamiento de sus recursos naturales marítimos, se unificaron y refundieron en un único texto legal las disposiciones existentes al respecto en la Ley 6/93, del 11 de mayo, de Pesca de Galicia.

En base a esta Ley se dispone, a través del Decreto 423/93 del 17 de diciembre, que la extracción de marisco y recolección de algas estarán sujetas al Plan General de Explotación Marisquera.

Los Planes Generales de Explotación son un conjunto de normas y orientaciones, de carácter anual, destinadas a regular y programar dicha extracción y recolección que sólo podrá ser ejercida por personas y embarcaciones con permiso de explotación. Serán aprobados por orden de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, después de consultar con las entidades representativas del sector.

En estos Planes se integran:

➤ Planes de explotación para autorizaciones marisqueras, elaborados por sus entidades titulares y presentados en las Delegaciones Territoriales de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos ajustándose al siguiente esquema: número de mariscadores y embarcaciones propuesto; períodos y zonas de explotación; número de

⁵ Datos obtenidos de la Plataforma Tecnológica da Pesca; www.pescadegalicia.com.

días previsto de actividad; normas de comercialización, vigilancia y tope de capturas por especies, por mariscador y por día.

➤ Normas de explotación para zonas de libre marisqueo, elaboradas de oficio por la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos después de consultar con los representantes del sector. En este caso, puede la Dirección General de Recursos Marinos, modificar las especies, períodos y zonas de extracción establecida en las normas.

➤ Planes específicos de explotación para zonas de libre marisqueo, elaboradas por las cofradías o entidades asociativas del sector ajustándose a los plazos y esquema de los Planes de explotación.

El artículo 114 del Decreto 424/93 define las artes de captura de moluscos bivalvos, entre las que se encuentran las específicas de solénidos. Entre los utilizados actualmente en Galicia se distinguen dos modalidades:

- a) **A pie.** Se realiza en bancos naturales a los que se tiene acceso a pie en las bajamares. Se pueden distinguir varias formas:
1. **Con sal:** Es una modalidad utilizada para *S. marginatus*. El método consiste en esparcir sal sobre los orificios que se abren, en forma de ocho, en la superficie del sedimento y que se denominan “ojo”. Al ser especies muy sensibles a la sal, los animales salen a la superficie y son capturados por el pescador.
 2. **Con fisga:** También se emplea en *S. marginatus*. Se trata de una varilla larga muy delgada y recta de unos 60 cm de longitud, que dispone de un pequeño arpón en el extremo. Se introduce en el agujero que dejan los sifones en el sustrato, atravesando al animal que cierra sus valvas, y tirando de la varilla hacia arriba se extrae el longueirón vello. El inconveniente del método es que se captura al animal dañado.

3. **Con sach o fouciño:** Son utensilios de labranza que permiten cavar en la arena a cierta profundidad y capturar los ejemplares. Cuando se localiza el “ojo”, la hoja del utensilio se clava al lado y se introduce lo más vertical posible, para que no se rompa la concha del individuo.
 4. **Con la mano:** Una vez que se localiza el “ojo” en el sustrato, se introducen los dedos corazón e índice hasta atrapar al ejemplar. A continuación, con la ayuda del dedo pulgar, se extraen con un suave giro de aproximadamente 180° para que el pie no se quede hacia atrás y así, evitar su rotura.
- b) **Buceo.** Los submarinistas dedicados a la pesca de estas especies hasta el año 2008 debían hacerlo en apnea. Los ejemplares son capturados a mano, y almacenados en unas bolsas de malla que llevan los buzos atados a la cintura. A partir de este año⁶, ya se podrá optar por hacerlo en apnea o con suministro de aire desde la embarcación que se encuentra en la superficie.

De todos los métodos descritos, el más selectivo y menos perjudicial para los ejemplares capturados, es la pesca a mano ya sea a pie o en buceo.

El tamaño mínimo de captura para las especies de *Ensis* es de 100 mm, impuesta por la Unión Europea en el Reglamento (CE) nº 1298/2000, y en *Solen marginatus* es de 80 mm (Reglamento (CE) nº 850/1998).

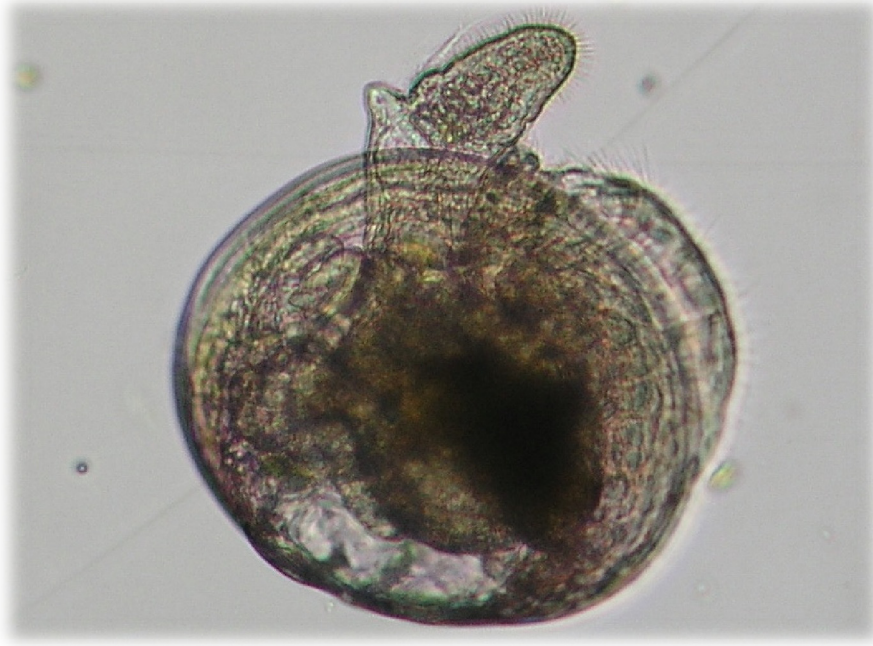
⁶ La Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos publica en el DOG N°68 de 9 de abril de 2008 el Decreto 64/2008, del 27 de marzo, por el que se regula la certificación profesional para la extracción de recursos específicos con técnicas de buceo en la Comunidad Autónoma de Galicia. Posteriormente, se modificará el Plan Xeral de Explotación Marisqueira para el año 2008 para que recoja estos cambios en los respectivos planes de explotación.

II. Objetivos

II. OBJETIVOS

Desde la década de los 90, en el Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo, se ha desarrollado el cultivo de navajas y longueirones con la financiación de distintos proyectos de investigación. Estos primeros estudios han permitido sentar las bases para el posterior desarrollo del cultivo en trabajos como el que se presenta aquí. Así, los objetivos específicos de esta memoria son:

1. Estudiar la viabilidad del cultivo de *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *Solen marginatus* en las distintas fases de criadero: acondicionamiento, cultivo larvario y cultivo de postlarvas y semilla.
2. Determinar el patrón de crecimiento de *S. marginatus* en el medio natural y la relación con los parámetros ambientales, a partir de semilla obtenida en criadero, hasta alcanzar la talla comercial.
3. Describir el desarrollo embriológico y larvario de estas especies, con microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido, como estudios básicos para implementar el cultivo larvario.
4. Estudiar la composición bioquímica a lo largo del desarrollo larvario de estas especies para estandarizar el cultivo larvario y comparar entre ellas las distintas estrategias seguidas por cada especie en el desarrollo larvario.
5. Estudiar la composición de ácidos grasos a lo largo del desarrollo larvario en estas especies para estudiar la estrategia seguida por cada especie en el desarrollo larvario.



III. Capítulo I: Cultivo

III.1.- INTRODUCCIÓN

III.1.1.- Cultivo en criadero

Las especies de solénidos que existen en Galicia son objeto de explotación por parte de los mariscadores; su captura está sujeta a planes de explotación elaborados por la administración en colaboración con el sector marisquero, basándose en el estado del recurso y en el conocimiento biológico de las especies. En algunos de los bancos naturales ha habido descensos de la producción, paulatinamente o de forma brusca, pudiendo estar motivado, tanto por una sobreexplotación del recurso como por descensos de los reclutamientos naturales. Para paliar este problema, una medida posible es suplir este descenso de producción con la siembra de juveniles trasladados de otros bancos naturales o bien obtenidos en criadero.

En los últimos años se ha desarrollado la tecnología para el cultivo intensivo de moluscos bivalvos en instalaciones adecuadas. Las investigaciones sobre estas instalaciones, criadero (hatchery) y semillero (nursery), comienzan en los años 50 y avanzan hacia la producción a escala industrial de algunas especies de bivalvos en los años 70, instalándose los primeros criaderos industriales en Galicia, y así, la Administración ubica un criadero en Ribadeo a finales de ésta década. En esta instalación, desde 1978, se vienen realizando cultivos larvarios, postlarvarios y de semilla, hasta una talla adecuada para su traslado al medio natural, de especies de moluscos bivalvos de interés comercial (Guerra, 1979). Los primeros trabajos se hicieron con la ostra plana (*Ostrea edulis*) y la almeja fina (*Ruditapes decussatus*), según las técnicas descritas por Loosanoff & Davis (1963) y Walne (1966). Basándonos en la técnicas empleadas para estos cultivos, y con adaptaciones en cada caso, se han cultivado otras especies de bivalvos de interés comercial en Galicia, como son: almeja babosa (*Venerupis pullastra*), almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) y coquina (*Donax trunculus*). Desde la década de los 90, también se lleva a cabo el cultivo de las especies de solénidos que se comercializan en Galicia: *Ensis arcuatus*, *Ensis siliqua* y *Solen marginatus* (Martínez, 2002). Aunque en esta fecha todavía no había demanda para su producción en criadero, las investigaciones se hicieron con el fin de conocer su biología y estudiar la posibilidad de incrementar su producción en el medio natural y, en algunos casos, de asegurar la sostenibilidad del recurso. En los últimos años se produjo un descenso en la producción de los bancos naturales de *Solen marginatus*,

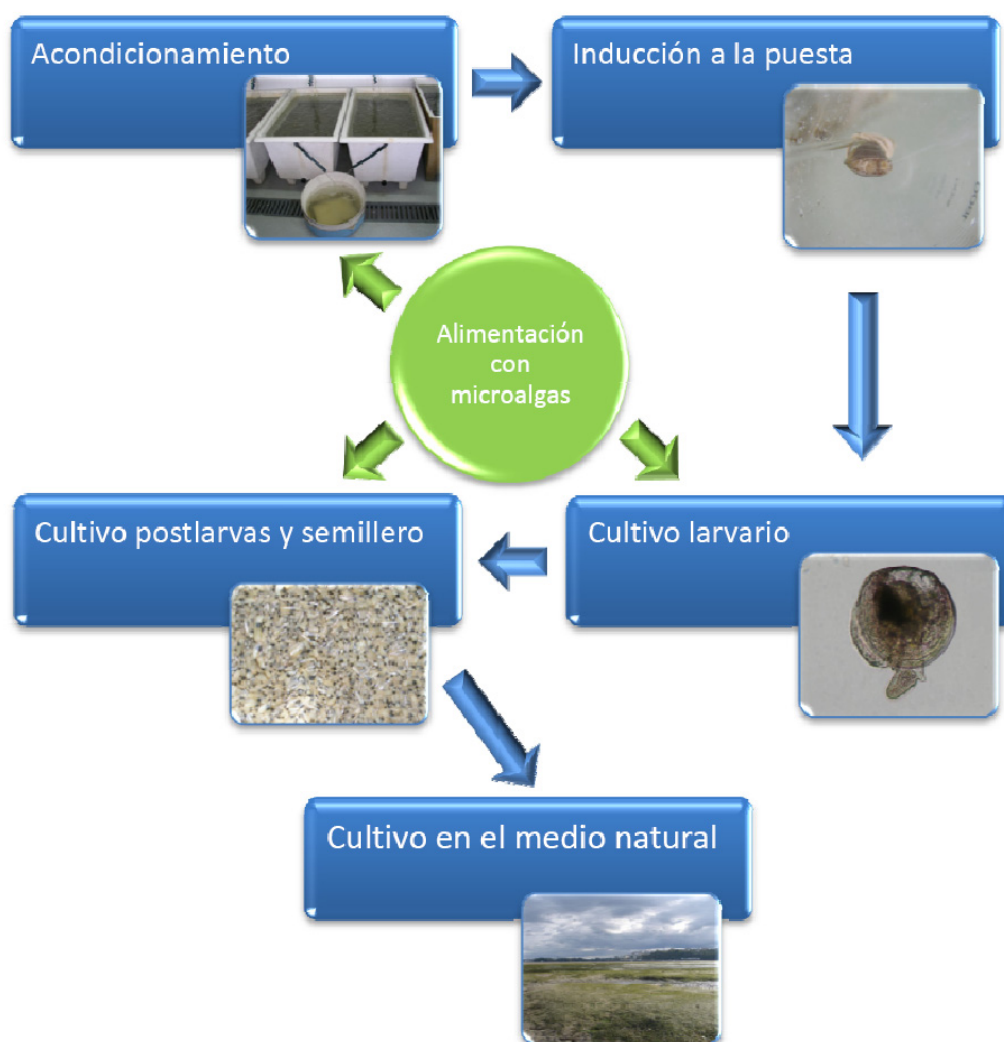
principalmente en las Rías Altas Gallegas, debido a elevadas mortalidades (Martínez, 2002), lo que supuso un descenso en los reclutamientos y, en definitiva, en la producción de adultos comerciales.

En otros lugares y con otras especies, el cultivo de solénidos comenzó a estudiarse hace tiempo. Así, en Norteamérica los primeros estudios se realizaron a escala de laboratorio con *Ensis directus* (Sullivan, 1948; Costello & Henley, 1971; Loosanoff & Davis, 1963), intentando en la actualidad llevarlo a escala industrial (Kenchington *et al.*, 1998; Leavitt & Burt, 2001; Leavitt *et al.*, 2002, 2005). También en Dinamarca se está estudiando esta especie (Freudendahl & Nielsen, 2005). En Norteamérica, a finales de los años 70, se comenzó a estudiar el cultivo de *Siliqua patula* (Breese & Robinson, 1981). En Chile, a partir de los años 90 se empiezan a desarrollar estrategias de cultivo para *Ensis macha* como respuesta a la fuerte presión que sufre ésta especie (Lépez, 2006). Recientemente, se ha comenzado a estudiar el cultivo experimental de *E. arcuatus* y *E. siliqua* en Irlanda del Norte (Reino Unido) (McDonough & Patiño, 2005; Cromie *et al.*, 2006; Martínez-Patiño *et al.*, 2007).

III.1.1.1.- Fases del cultivo de bivalvos

El esquema III.1 explica las distintas fases del cultivo en criadero, la interrelación entre ellas y el cultivo en medio natural. Éstas (acondicionamiento, cultivo larvario, postlarvario y de semilla) se relacionan directamente con la alimentación a base de microalgas. Se comienza el cultivo en criadero con el traslado de progenitores procedentes del medio natural. Dependiendo del estadio inicial de madurez se siguen dos estrategias distintas: 1: si están en reposo o iniciando la gametogénesis, se realizará acondicionamiento, y 2: si están maduros, se utilizan para inducción a la puesta. Una vez los individuos acondicionados alcanzan la madurez, también se utilizan para la inducción a la puesta. El objetivo es conseguir la liberación de gametos maduros con los que realizar la fecundación para iniciar el cultivo larvario hasta la fijación. Una vez las larvas superan la metamorfosis, transformándose en postlarvas, se mantendrán en unos sistemas de cultivo de postlarvas y semilla adecuados. Cuando se alcanza una talla apropiada para su traslado y supervivencia en el medio natural, ésta abandona el criadero.

En los siguientes apartados, se va a exponer con más detalle las características más relevantes de cada fase.



Esquema III.1. Fases de cultivo en criadero y medio natural.

III.1.1.2.- Alimentación: microalgas marinas

La definición de microalga es compleja puesto que representa a un grupo taxonómicamente diverso de organismos en vez de una única categoría filogenética. Una definición funcional de microalga podría ser “microorganismo unicelular o colonial”. Su tamaño varía desde 1 μm hasta varios cientos de micrómetros, pudiendo formar colonias y cadenas de microalgas que midan varios centímetros ($\sim 2,5$ cm). El fitoplancton en los océanos, con una producción de varios cientos de billones de toneladas de peso seco por año (Pauly & Christensen, 1995), es la base de la cadena

trófica acuática, contribuyendo a la producción de alrededor de 100 millones de toneladas de recursos renovables por año para la pesca.

Los moluscos bivalvos se alimentan del fitoplancton gracias a las células epiteliales ciliadas y mucosas que recubren las branquias. Mediante un complejo mecanismo de corrientes y contracorrientes en la cavidad paleal, llegan las partículas seleccionadas, embebidas en moco, hasta los palpos labiales y a la boca. En el caso de las larvas, el velo es el órgano que realiza la retención de las partículas, y permite su transporte hasta la boca mediante el movimiento ciliar.

La calidad y cantidad de alimento que se suministra, son parámetros importantes en el éxito de las distintas fases del cultivo. Así, el tamaño de partícula se debe tener en cuenta puesto que, en la mayoría de los bivalvos, la eficiencia de retención del 100% se da en partículas que están en el rango de 3 a 14 μm (Møhlenberg & Riisgård, 1978). En el cultivo, los tamaños de microalgas más usados como alimento varían de 2 a 10 μm .

El valor nutricional de las microalgas es un aspecto importante en la elección de las especies que se van a suministrar en la dieta. Sus características, desde un punto de vista bioquímico y de la composición de ácidos grasos, se van a analizar en los capítulos III y IV, respectivamente.

El crecimiento de larvas y juveniles de bivalvos marinos es muy variable en función de las especies microalgales empleadas (Bayne, 1965; Waldock & Nascimento, 1979; Nascimento, 1980; Enright *et al.*, 1986a; Laing & Millican, 1986; Delaunay, 1992). En general, se observa que la mezcla de varias especies microalgales (dietas multiespecíficas) tienen un efecto sinérgico sobre el crecimiento de las larvas de los bivalvos marinos (Epifanio, 1976) indicando ésto que, las posibles deficiencias son compensadas según las microalgas utilizadas.

Suministrar cantidades adecuadas es tan importante como la calidad del alimento empleado. Así, el efecto de la ración se ha estudiado en las distintas fases de cultivo en criadero, en el acondicionamiento (Utting & Millican, 1997), cultivo larvario

(O'Connor & Heasman, 1997; Doroudi & Southgate, 2000) y en el cultivo postlarvario y de semilla (Laing, 1995, 2000; Caers *et al.*, 1999; Fernández-Reiriz *et al.*, 2006).

En el cultivo de bivalvos marinos se han seleccionado las diferentes microalgas que van a tener la siguiente clasificación taxonómica (De Pauw & Persoone, 1988):

- 1.- **CLASE BACILLARIOPHYCEAE (DIATOMEAS):** *Chaetoceros calci-trans*, *Skeletonema costatum* y *Phaeodactylum tricornutum*.
- 2.- **CLASE HAPTOPHYCEAE:** *Isochrysis galbana*.
- 3.- **CLASE CHRYSOPHYCEAE:** *Monochrysis (Pavlova lutheri)*.
- 4.- **CLASE PRASINOPHYCEAE:** *Tetraselmis suecica*.

III.1.1.3.- Acondicionamiento

El acondicionamiento es una fase importante del cultivo de moluscos bivalvos en criadero (Wilson *et al.*, 1996). Este proceso consiste en mantener los adultos en las instalaciones de cultivo en unas condiciones adecuadas para controlar el desarrollo gonadal y conseguir períodos de madurez diferentes a los que presentan en el medio natural, así en individuos cuyo ciclo reproductivo presenta cortos períodos de madurez se puede conseguir que las puestas sean más prolongadas en el tiempo. La finalidad es potenciar la fecundidad de los progenitores, la calidad de los huevos y la viabilidad larvaria (Utting & Millican, 1997).

El acondicionamiento se realiza manipulando el medio físico y la alimentación para promover el desarrollo gonadal y la gametogénesis.

El factor físico más estudiado es la temperatura del agua. Se ha demostrado que es un factor determinante en la regulación de la reproducción en bivalvos (Sastry, 1968; Robinson, 1992). Los cambios de temperatura estacionales frecuentemente están correlacionados con el desarrollo gonadal y la gametogénesis en invertebrados marinos (Sastry, 1979). Incrementos relativos en la temperatura comúnmente favorecen el proceso de vitelogénesis (Robinson, 1992). Por el contrario, la proliferación celular que precede a la vitelogénesis es independiente de la temperatura (Sastry, 1968; Griffond *et al.*, 1992). Un aumento durante el período previtelogénico puede producir un

incremento del metabolismo, estimulando la utilización de las reservas energéticas que, de otro modo, se requerirían para la vitelogénesis (Griffond *et al.*, 1992).

Las condiciones de fotoperíodo son tan importantes como la temperatura en el control del desarrollo ovocitario en algunas especies como *Pecten maximus* (Paulet & Boucher, 1991). A pesar de ello, se han llevado a cabo pocos estudios en laboratorio relacionados con el fotoperíodo. Sastry (1966), acondicionó *Aequipecten irradians* con 12 h de luz y 12 h de oscuridad. En *Pecten maximus* se observó una mayor fecundidad con 15 h de luz y 9 h de oscuridad (Devauchelle & Mingant, 1991). En *Chlamys varia* se estudió el efecto del fotoperíodo con dos regímenes de iluminación, 8 y 16 horas de luz, consiguiendo máximos de madurez entre los 40 y 60 días con 16 horas de iluminación (Abad *et al.*, 2005; Martínez *et al.*, 2005a). Silva *et al.* (2002), estudiaron el efecto del fotoperíodo en el acondicionamiento de *Ruditapes decussatus*, consiguiendo la maduración tras 60 días con 16 horas de luz.

Martínez *et al.* (2005b) estudiaron el efecto combinado del fotoperíodo y la ración de alimento en el acondicionamiento de *Ruditapes decussatus*, encontrando los mejores resultados con fotoperíodo positivo (16 h día: 8 h noche) y una ración del 6% del peso seco. Fabioux *et al.* (2005) probaron con el fotoperíodo y la temperatura en *Crassostrea gigas*, manteniendo a los reproductores en un régimen natural, uno acelerado y otro de invierno. Estos autores lograron obtener gametos a lo largo de todo el año, incluyendo el período de reposo de otoño.

La salinidad del agua de mar es otro factor que debe ser controlado, puesto que valores de salinidad subóptimos pueden afectar al desarrollo, a la maduración de los ovocitos y a la viabilidad larvaria (Muranaka & Lannan, 1984).

Otro factor importante en la gametogénesis es la alimentación, la dieta puede afectar a la composición de las gónadas de los adultos y por tanto, a los ovocitos y a las larvas (Pernet *et al.*, 2003). Utting & Millican (1997), revisan las mezclas de algas empleadas en diferentes raciones en experiencias con distintos grupos de bivalvos, demostrando que, las dietas compuestas por mezclas de diferentes especies de microalgas, producen mejores resultados que los obtenidos con monocultivos.

Además de la composición de la dieta se ha de analizar la ración. Debe reducirse el nivel de estrés causado a los reproductores, por ejemplo, evitando bajas raciones de alimento que provocarían un descenso de la fecundidad y de la calidad de los huevos, produciéndose un menor número de larvas y menos competentes (Gallager & Mann, 1986).

Normalmente la estabulación de reproductores en bivalvos se hace en el interior de tanques, como en venéridos y ostreidos. Otras especies necesitan sustrato, como los solénidos (Martínez, 2002). Son especies que viven enterradas a cierta profundidad en el sustrato. La presión de la arena mantiene las valvas cerradas cuando se encuentran enterradas. Si por cualquier condición adversa, éstas se abren durante un período largo de tiempo, son incapaces de recuperarse debido a la debilidad de los músculos retractores en relación a la longitud de las valvas.

III.1.1.4.- Inducción a la puesta

La siguiente fase es la inducción a la puesta o “spawning”, que es el procedimiento por el cual los bivalvos maduros son estimulados a liberar sus gametos en respuesta al estímulo que se les ha aplicado. La inducción a la puesta en un criadero permite obtener puestas cuando se necesiten, siempre que los individuos presenten gametos maduros. Ésto permite planificar los cultivos, además de realizar una fecundación controlada. Existen diversos métodos de inducción en bivalvos:

- ✓ **Métodos físicos:** el choque térmico, como en *Venerupis pullastra* y *V. aurea* (Le Pennec, 1970) o en *Pecten maximus* (Román & Pérez-Camacho, 1976); añadiendo gametos, según Galtstoff (1930) en *Crassostrea gigas* y *C. virginica*; y el efecto combinado de los cambios de temperatura y adición de gametos, como en *C. gigas* (Davis, 1953; Loosanoff, 1954).
- ✓ **Métodos químicos:** como la inyección de serotonina en *Ruditapes decussatus*, *R. philippinarum* y *P. maximus* (Pérez-Camacho & Román, 1987); de peróxido de hidrógeno (H₂O₂) en *Mytilus edulis* y *M. californianus* (Morse *et al.*, 1977); de cloruro potásico (KCl) en *M. edulis* (Iwata, 1951a); de hidróxido amónico (NH₄OH) o cloruro de bario (BaCl₂) en *M. edulis* y *R. philippinarum* (Iwata,

1951b); hidróxido potásico (NaOH) para subir el pH del agua en *Patinopecten yessoensis* (Kinoshita, 1943); e inyectar soluciones de amoníaco (NH₃) en la gónada de *Mercenaria mercenaria* y *R. philippinarum* (Loosanoff & Davis, 1963).

- ✓ **Otras técnicas:** como el método fotoquímico, con flujo de agua pasada por ultravioleta sin añadir alimento en *Chlamys opercularis* (Le Pennec, 1981); o concentraciones elevadas de alimento en *Siliqua patula* (Breese & Robinson, 1981).

III.1.1.5.- Cultivo larvario

La calidad de los ovocitos es uno de los factores más determinantes en la viabilidad larvaria, pudiendo estar referida al tamaño y/o volumen de los ovocitos, a la composición bioquímica o a ambas. La influencia de la composición bioquímica de los ovocitos en el cultivo larvario se abordará en el capítulo III (Bioquímica de las larvas). Pequeños cambios en el tamaño de los ovocitos pueden ser importantes en la supervivencia larvaria (Kraeuter *et al.*, 1982). Ésto es debido a que puede reflejar cambios en la cantidad de reservas bioquímicas almacenadas en el huevo.

Las primeras fases del cultivo de bivalvos (desarrollo embrionario y larvario) presentan mayores mortalidades que las fases posteriores (cultivo postlarvario y de semilla). Por lo tanto, el éxito de los cultivos dependerá de la superación de dos etapas cruciales en el desarrollo larvario, la embriogénesis y la metamorfosis (paso de larva a postlarva).

Entre los factores ambientales que afectan al crecimiento de las larvas, la temperatura, salinidad y alimentación son los que han recibido más atención (Bayne, 1983). En el control de la nutrición, además de la cantidad, se debe controlar la calidad del alimento suministrado para cubrir todas las necesidades nutricionales de larvas y postlarvas. Otro de los factores importantes en el cultivo larvario es la temperatura a la que se desarrolla, puesto que cada especie tiene un rango óptimo en el que se maximiza crecimiento y supervivencia hasta la metamorfosis. La salinidad es también importante, ya que valores por debajo de los óptimos pueden reducir mucho el éxito de los cultivos.

También se debe tener en cuenta la microbiología de los cultivos. El crecimiento de bacterias se estimula por las altas concentraciones de nutrientes orgánicos presentes en los cultivos larvarios (Manahan & Stephens, 1983) y por el estancamiento del agua debido a las técnicas de cultivo (Zobell & Anderson, 1936). Para mantener el control de las infecciones oportunistas se deben realizar una serie de prácticas de mantenimiento, como mantener los stocks algales libres de patógenos, usar agua de mar libre de patógenos (filtrada y esterilizada con ultravioleta), cambios de agua frecuentes y aplicación de técnicas de limpieza y desinfección del equipamiento (Elston, 1984).

La fijación o metamorfosis se produce cuando la larva de vida planctónica pasa a un modo de vida sésil o bentónico, con apariencia de adulto. La larva comienza a desarrollar el pie con el que reptará en el sustrato (estadio de pediveliger) y el velo persiste. Posteriormente éste se pierde o reabsorbe, perdiendo la función de captación de alimento y desplazamiento, comenzando a desarrollarse los filamentos branquiales.

Además, en paso de larva a juvenil, se producen cambios como la reorientación de los órganos, aparición de los palpos labiales, el desarrollo del sistema digestivo, aumentando la complejidad del mismo (desarrollo de la glándula digestiva, las distintas porciones del estómago y alargamiento del saco del estilo), diferenciación de los nervios y ganglios, desarrollo del corazón y los sistemas vascular y excretor, y desarrollo de los pliegues del manto, musculatura y tentáculos (Elston, 1999).

Posteriormente, la joven postlarva comienza el desarrollo de la concha propia del adulto, la disoconcha, secretada por el manto.

III.1.1.6.- Cultivo postlarvario

De la calidad de las postlarvas obtenidas y del sistema empleado va a depender el éxito del cultivo en semillero.

Además, los resultados obtenidos durante el cultivo de semilla variarán en función de varios factores, así Lucas (1977) cita: la densidad de la semilla, el flujo de agua, la calidad del agua, la temperatura y salinidad como factores físicos. En relación con la alimentación afectan: la cantidad y calidad del alimento, y la tasa de

alimentación, que puede ser continua o discontinua. Además, la frecuencia de las operaciones de manejo va a influir en el comportamiento de cada especie en el criadero.

En el caso de estas especies es también destacable el sistema empleado y el uso de sustrato (Darriba *et al.*, 2002; Martínez, 2002), debido a que, igual que los adultos de estas especies, la semilla necesita de sustrato para mantenerse enterrada y mantener las valvas cerradas.

El cultivo de postlarvas lleva implícito el cultivo de fitoplancton en volúmenes cada vez mayores, puesto que tras la fijación se produce un incremento radical en las tasas de crecimiento y de filtración. A mayor talla aumenta la demanda de alimento. Así, cuando la semilla alcanza una talla de aproximadamente 1 ó 2 mm, el consumo de fitoplancton en el semillero es muy elevado, con lo que en muchos casos, se rebasa el límite de factibilidad técnica. Por eso, la semilla debe ser transferida lo antes posible al medio natural, para que continúe su crecimiento hasta talla comercial.

III.1.2.- Cultivo en el medio natural

Diversos factores afectan al crecimiento y supervivencia de la semilla en el medio natural, tales como: la talla inicial de siembra, las condiciones ambientales, la competencia y el sistema empleado.

La talla inicial de siembra es importante, ya que la respuesta adaptativa va a depender del tamaño de la semilla. Una menor talla de siembra implica que el daño en los muestreos se puede incrementar, con lo que se reduciría la supervivencia. A su vez, esta menor talla va implicar que tarden un mayor tiempo en alcanzar la talla comercial, incrementándose la mortalidad.

Las condiciones ambientales son un factor determinante en el crecimiento de juveniles en el medio natural, siendo los más importantes la temperatura y el alimento (Bayne & Newell, 1983). Hay otros parámetros ambientales importantes como la salinidad.

La competencia es la búsqueda de soluciones a una necesidad por los miembros de una misma o distinta especie. Desde el punto de vista del cultivo, inciden tres tipos de competencia: por el espacio, por la comida y por el oxígeno (Royo & Ruiz-Azcona, 2005).

El sistema empleado para el mantenimiento de los juveniles es determinante en el éxito de las experiencias. Lépez *et al.* (2008), engordaron la navaja *Ensis macha* en cultivo suspendido con un dispositivo denominado “BDC”, en piletas con flujo continuo de agua de mar sin filtrar o en el submareal en recintos cubiertos de malla. Con semilla de *E. directus* se han realizado experiencias con y sin cobertura de malla como protección (Leavitt & Burt, 2001; Leavitt *et al.*, 2002, 2005). Darriba (2001), realizó experiencias con juveniles de 6 cm de *E. arcuatus*.

El crecimiento se puede cuantificar en términos de incremento en talla (longitud y altura) y de peso. Diversos parámetros ambientales (temperatura, fotoperíodo, alimento, salinidad, etc.) y otros, como la edad de los individuos o la estructura de la población afectan al crecimiento. Cada etapa del desarrollo de un bivalvo parece ajustarse a diferentes modelos matemáticos de crecimiento, así Urban (2002), modelizó el crecimiento para la ostra *Pinctata imbricata* según las diferentes fases del cultivo.

Existen numerosos métodos para evaluar el crecimiento de bivalvos juveniles y adultos: marcado y recaptura en *Arctica islandica* (Ropes *et al.*, 1984); análisis de distribución de frecuencias en *Chamelea gallina* y *Ensis minor* (Frogia, 1975); recuento de anillos externos en *Ensis siliqua* (Gaspar *et al.*, 1994), en *Ensis directus* (Swennen *et al.*, 1985; Beukema & Dekker, 1995) y en *Ensis macha*, *Tagelus dombeii* y *Venus antiqua* (Urban, 1996); estudio de láminas de acetato en *Cerastoderma edule* (Richardson *et al.*, 1979), Gaspar *et al.* (1994) en *Ensis siliqua*, Henderson & Richardson (1994) en *E. siliqua* y *E. ensis*, Gaspar (1996) con *Spisula solida*, *Venus striatula*, *Donax trunculus* y *E. siliqua*, y Robinson & Richardson (1998) en *Ensis arcuatus*; y el estudio directo de semilla obtenida en criadero y sembrada en el medio natural, con *E. arcuatus* (Darriba, 2001). En este estudio se ha utilizado el estudio directo de semilla obtenida en criadero y sembrada en el medio natural pese a la dificultad de obtención de semilla en criadero y su posterior seguimiento. Este método

permite obtener resultados más fiables al no ser necesaria ninguna calibración, ni existir el sesgo debido al observador.

III.1.3.- Objetivos del capítulo

En este capítulo se aborda el estudio de las distintas fases de cultivo en criadero, desde el acondicionamiento hasta el cultivo de semilla en el medio exterior, en la navaja (*Ensis arcuatus*), el longueirón (*Ensis siliqua*) y el longueirón vello (*Solen marginatus*). Una vez se obtienen los ovocitos, se analiza el cultivo de los embriones y larvas hasta la fijación, para establecer unos desarrollos larvarios estándar y poder comparar entre las tres especies estudiadas. Tras la fijación se cultivan las postlarvas y semilla de las tres especies para conocer mejor su biología y estudiar su comportamiento en criadero. Además, en el caso del longueirón vello (*S. marginatus*), se realiza una siembra en recintos controlados para seguir el crecimiento hasta talla comercial (80 mm), con el fin de conocer el tiempo que tardan en alcanzar esta talla.

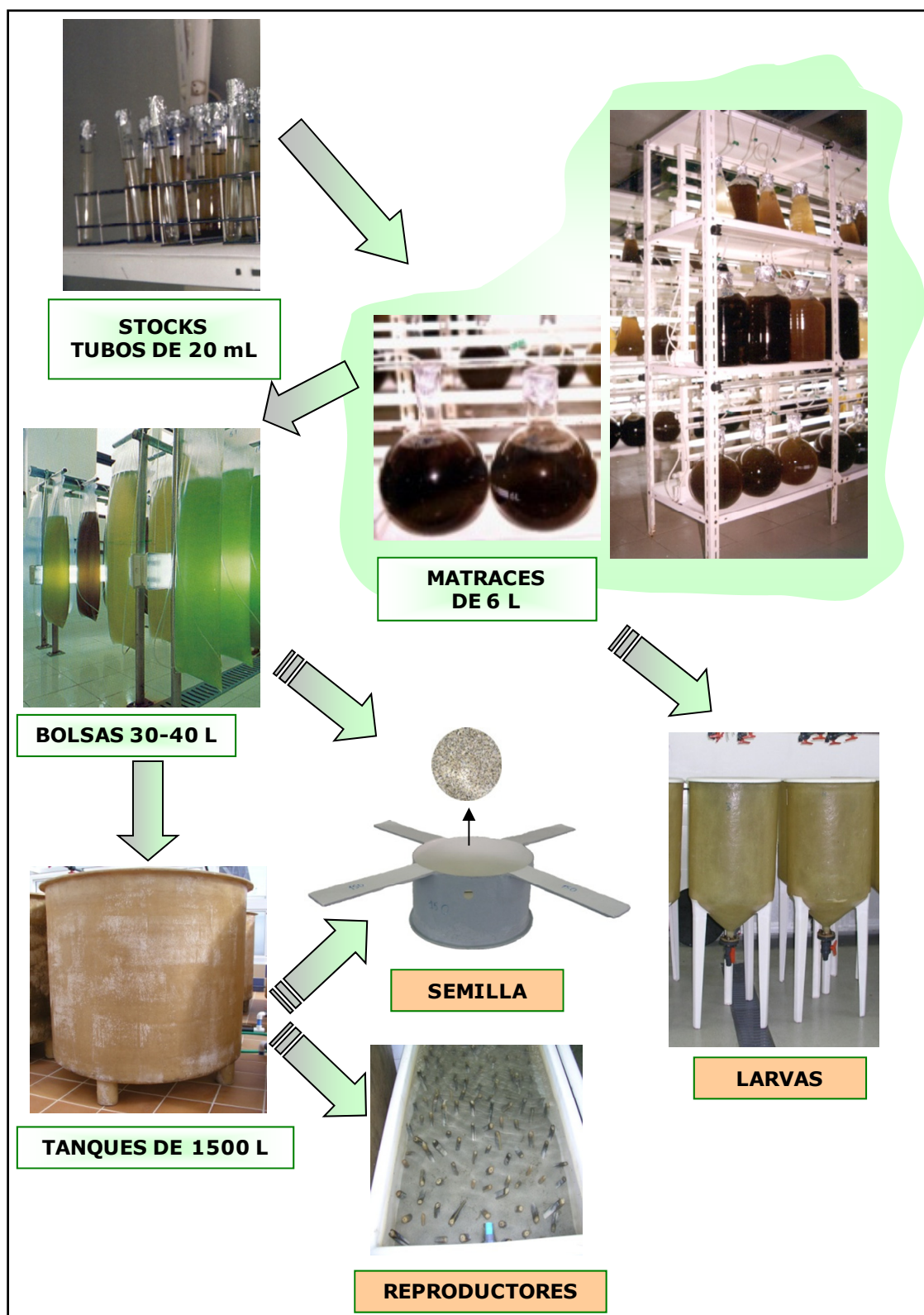
III.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

III.2.1.- Cultivo de microalgas

Las especies de microalgas empleadas para los cultivos de estas tres especies de solénidos en el Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo fueron: *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Skeletonema costatum*, *Chaetoceros calcitrans*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Tetraselmis suecica* (Esquema III.2).

Se hacen crecer en cultivos monoespecíficos con agua de mar (32-35‰ de salinidad) filtrada inicialmente por filtro de arena y a continuación, por filtros de cartucho de 5 µm. Las primeras fases del cultivo de microalgas se desarrollan en una cámara isoterma a una temperatura constante de 19±1°C. Las cepas de las algas se mantienen en tubos de 20 ml, para su posterior utilización como inóculo de recipientes de mayor volumen. Para el cultivo en matraces de 6 litros el agua se esteriliza en autoclave. Se mantienen con luz artificial constante y burbujeo con aire enriquecido en CO₂. Para el cultivo de las microalgas en esta fase, el agua se enriquece con una solución de sales nutritivas ALGAL-1, compuesta por nitrato potásico, fosfato monosódico, oligoelementos (Fe, Zn, Mn, Mo, Co, Cu y EDTA) y vitaminas. Además, en el cultivo de las diatomeas, se añade sodio silicato.

El siguiente volumen cultivado son bolsas plásticas de 30-40 litros, que se mantienen con aireación sin enriquecimiento en CO₂ y con distinta iluminación (artificial en el criadero y natural en el invernadero). Como medio nutritivo se utiliza solución C y en las diatomeas se complementa con sodio silicato. La solución C está formada por nitrato potásico, fosfato potásico y una traza de metales (Fe, Mn, Zn, Cu, Co y Mo). El fitoplancton producido en este sistema se utiliza para alimentar a la semilla y reproductores, y como inóculo para tanques circulares de 1.500 litros, que serán usados para producir alimento para la semilla y adultos. Los nutrientes utilizados en estos tanques son, fosfato monoamónico y nitrato, además de los silicatos para las diatomeas.



Esquema III.2. Sistemas de cultivo de las microalgas en las distintas fases de cultivo.

III.2.2.- Recogida de reproductores y traslado al laboratorio

Se utilizaron como progenitores individuos de las tres especies de talla superior a la comercial procedentes de bancos naturales. En concreto, la navaja (*Ensis arcuatus*), se capturó mediante buceo en apnea en el banco submareal de Rodas en Islas Cíes (Ría de Vigo). En la zona submareal de la playa de O Sardiñeiro (Ría de Corcubión), se recogieron los individuos de longueirón (*Ensis siliqua*), también por buceo en apnea. El longueirón vello (*Solen marginatus*), se capturó empleando el método de la sal en el banco intermareal de “A Barra” en Redondela (Ría de Vigo).

Un traslado adecuado de los progenitores al criadero permite asegurar que lleguen en buen estado. Esto es necesario para aumentar el rendimiento de las puestas y mejorar su calidad. Son especies delicadas, como se ha comentado en el apartado III.1.1.3., por lo que se debe hacer un transporte con cuidado. El sistema empleado consiste en atar con gomas haces de aproximadamente 20 ejemplares, envolverlos en paños húmedos con agua de mar en nevera isoterma y llevarlos al Centro de Cultivos Marinos-CIMA de Ribadeo.

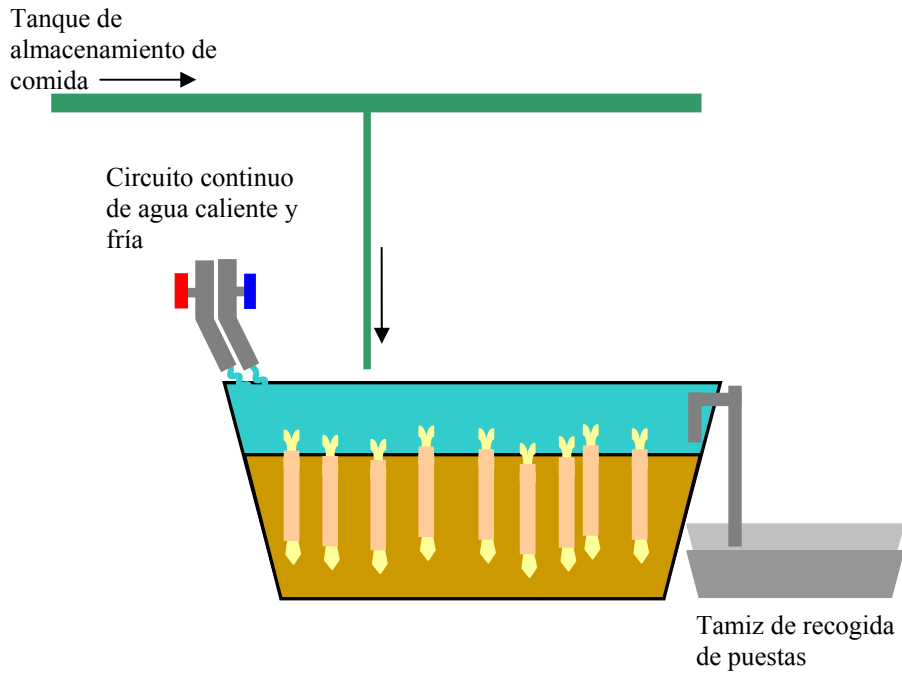
III.2.3.- Acondicionamiento

III.2.3.1.- Sistema de mantenimiento

Con las tres especies se diseñó una experiencia de modo que se han acondicionado en las mismas condiciones para comprobar el efecto del estadio gametogénico inicial en la maduración gonadal de los individuos acondicionados.

Para ello se emplearon tanques de 200 litros, rectangulares de fibra de vidrio, con un área de 95 x 60 cm y una altura de 45 cm (Esquema III.3). Los tanques estuvieron en circuito abierto y con un flujo de agua de 18 litros/hora.

Se dispusieron 80 individuos por tanque, realizando la experiencia por duplicado. Los reproductores se mantuvieron con una capa de arena de grano medio-fino (entre 100 y 600 μm de diámetro) de unos 30-40 cm de espesor. La temperatura durante la experiencia fue de $18\pm 1^\circ\text{C}$ y la salinidad de 32-35‰.



Esquema III.3. Esquema del mantenimiento de reproductores para el acondicionamiento.

La alimentación consistió en una dieta mixta compuesta por: *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans*, *P. tricornutum* y *S. costatum*. La ración de microalgas fue del 4% en peso seco de algas con respecto al peso seco de los reproductores.

La mortalidad se controló con una periodicidad diaria. Se dispusieron tamices en el desagüe para la recogida de puestas viables.

III.2.3.2.- Procesado e histología

Mensualmente se realizaron controles histológicos de la maduración gonadal de 20 individuos.

Los individuos en el laboratorio se mantuvieron atados con gomas, y sumergidos en agua salada un mínimo de 1 hora para la eliminación de arena.

Para cada individuo diseccionado se determinaron los parámetros biométricos: longitud (distancia comprendida entre los dos extremos de la concha, anterior y posterior), altura (distancia entre la parte dorsal y ventral, medida a la altura del umbo), espesor (la mayor distancia entre las dos valvas, medida a la altura del umbo), peso

fresco del individuo, peso fresco de las valvas, peso fresco de la vianda y peso seco de las valvas. Se utilizó un calibre digital Mitutoyo (0,01 mm de resolución) y balanza de precisión GRAM Precission ST 3100 (D.E.=0,01 g). El peso seco de las valvas se obtuvo tras mantener en la estufa a 100°C las valvas durante 24 horas y enfriando en desecador hasta peso constante.

De cada ejemplar diseccionado se separaron la glándula digestiva, la gónada y el resto de la vianda. Una sección del pie de 1 cm³, próxima a la glándula digestiva y con gónada en su interior, se introdujo en un cassette para el análisis histológico.

A partir de estos datos se calculó el Índice de Condición Gonadal (I.C.G.) y de la Glándula Digestiva (I.C.D.) de la siguiente forma: [(peso fresco del tejido (gónada o glándula digestiva)/ peso seco de las valvas)] x 100.

Histología

Para la fijación se sumergen las muestras (porción de pie con la gónada) en fijador Davidson durante 24 horas.

Se deshidratan en alcoholes de graduación creciente (50°, 80°, 96° y 100°) y se incluyen en parafina a 60°C. Las preparaciones se han realizado con cortes de 7 µm de espesor, con un microtomo Micron HM 340 E. La tinción utilizada fue hematoxilina-eosina.

La caracterización descriptiva de las fases del ciclo reproductivo se realizó a partir de la observación al microscopio de las preparaciones histológicas, siguiendo la escala gametogénica descrita por Gaspar (1996) para *Ensis siliqua*. Esta escala diferencia varios estadios: Estadio 0 (E0) de reposo sexual, Estadio I (EI) o gametogénesis inicial, Estadio II (EII) o gametogénesis avanzada, Estadio III (EIII) de madurez, Estadio IV (EIV) o desove y Estadio V (EV) de post-puesta.

III.2.4.- Inducción a la puesta

Posteriormente para la inducción a la puesta se dispusieron en tanques de 200 litros de volumen, atados individualmente con gomas a varillas de vidrio (Fig. III.1.a). Se indujo la puesta en grupos de 25 individuos por tratamiento probando diferentes metodologías:

- ✓ Choque térmico añadiendo gametos masculinos y microalgas. Para ello se varió la temperatura añadiendo agua de mar filtrada enfriada a 5-10°C, permaneciendo a esta temperatura entre 30 y 60 minutos. Posteriormente, se vaciaba el tanque y rellenaba con agua calentada hasta 25-27°C, añadiendo gametos y microalgas, manteniendo la temperatura entre 30 y 60 minutos. A continuación, se realizaban cambios de temperatura sucesivos, hasta repetir 5 veces los ciclos de agua fría-caliente.
- ✓ Raspado de las gónadas y mezcla de gametos femeninos y masculinos en agua de mar filtrada, según lo descrito por Breese & Robinson (1981) para *Siliqua patula*. Los individuos se diseccionaron, retirando los gametos de las gónadas y separando machos y hembras. Posteriormente, se realizó un homogenizado de las gónadas separadas por sexos y se disolvieron en agua de mar filtrada y esterilizada por ultravioleta. A continuación, se realizaron intentos de fecundación.
- ✓ Flujo de agua filtrada y esterilizada con ultravioleta (UV). Los ejemplares se mantuvieron con un flujo de agua esterilizada con UV de 100 litros hora⁻¹ durante un período de 3-4 horas.
- ✓ Cambio de niveles de agua, en los que se simula el efecto de las mareas. Los individuos se sometieron a cambios sucesivos en los niveles de agua del tanque, exponiéndolos a breves períodos de desecación. Los cambios de nivel se llevaron a cabo cada 2 horas y la temperatura del agua fue de 15±1°C.

Además, se dispuso de un tanque control al que no se le aplicó estímulo alguno, simplemente se mantuvieron en los tanques, sin variar las condiciones habituales de estabulación.

Cuando los reproductores liberaron los gametos se hizo una fecundación controlada, añadiendo a los ovocitos una pequeña cantidad de esperma. Tras ser contados y medidos en una lupa acoplada a un analizador de imagen (PC Image), se trasvasaron a tanques de cultivo.

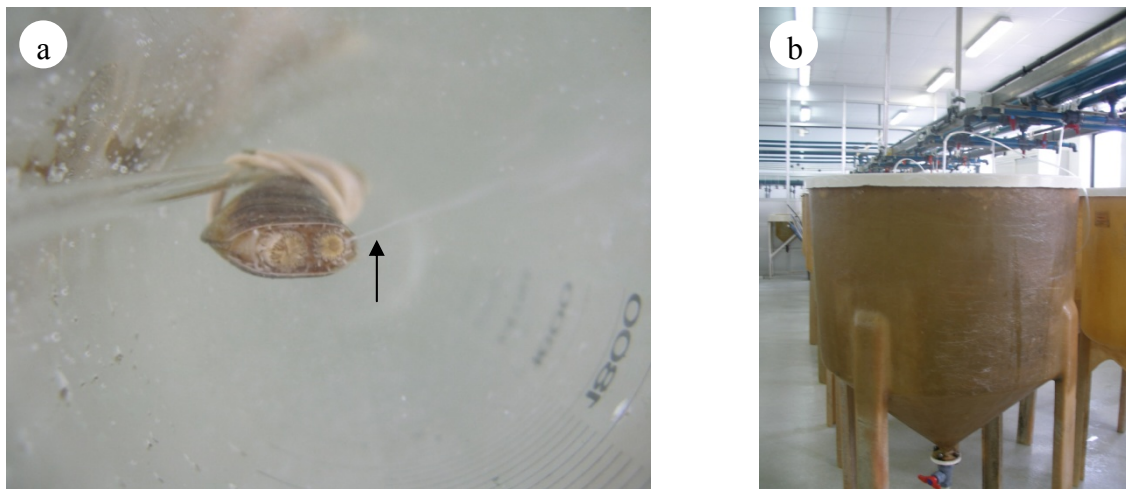


Fig. III.1.a. Hembra de *Ensis arcuatus* desovando colgada en una varilla. b. Tanque de cultivo larvario.

III.2.5.- Cultivo larvario

La incubación de los huevos y el cultivo larvario se realizó en tanques troncocónicos de fibra de vidrio de 500 litros (Fig. III.1.b), en los que se utilizó una densidad inicial de 5 huevos fecundados ml^{-1} , hasta 1-2 larvas ml^{-1} al final del cultivo, en la metamorfosis. El cambio de agua se realizó tres veces a la semana con agua filtrada por filtro de arena, cartucho de 1 μm y esterilizada por ultravioleta. La temperatura de cultivo se mantuvo en $19 \pm 1^\circ\text{C}$, con una salinidad de 32-35‰. Las experiencias se hicieron por duplicado.

La dieta estuvo compuesta por las microalgas *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri* y *C. calcitrans* en igual proporción y el suministro de alimentación fue diario. Se

comenzó la alimentación en el día 1 (larva D) con una ración de 40 células equivalentes μl^{-1} , aumentándola paulatinamente hasta 80 células equivalentes μl^{-1} .

III.2.5.1.- Recogida de muestras y control biométrico

Las muestras de los diferentes estadios embrionarios y larvarios se observaron “*in vivo*” al microscopio óptico. Se recogieron del total de larvas que se dispusieron en un vaso de precipitado de volumen conocido. Se homogenizaron, se tomaron 10 alícuotas que se depositaron en portaobjetos excavados y se procedió al conteo de las mismas bajo lupa. A partir de estas alícuotas se calculó el número total de larvas presentes en el cultivo. Para el seguimiento del crecimiento se midió la longitud y el alto de 50 larvas elegidas aleatoriamente con una lupa acoplada a un analizador de imagen. Además, se contaron para poder calcular la supervivencia.

Se estimó que un 5% de la población se perdió por operaciones de manejo y selección en cada cambio. El cálculo de la supervivencia se realizó a partir del número inicial de ovocitos liberados y del número inicial de larvas D.

Para el estudio del peso seco en las distintas fases se recogieron 6 muestras en cada fase, cuyo número era conocido. Se lavaron con formiato amónico (3%) para eliminar las sales y se congelaron para su posterior liofilización. Cuando las muestras estaban liofilizadas, se mantuvieron en desecador durante 1 hora y se pesaron en balanza de precisión Sartorius MC 210S (D.E.=0,01 mg). A continuación, se les restó la tara para hallar el peso seco.

A lo largo del cultivo se recogieron muestras en distintos días según las especies (Tabla III.1), de modo que se tuviesen muestras de fases significativas de todo el desarrollo.

Tabla III.1. Días de recogida de muestras para cada especie (coloreado de amarillo) y fase del desarrollo larvario con la que corresponden.

| Días | <i>Ensis arcuatus</i> | <i>Ensis siliqua</i> | <i>Solen marginatus</i> |
|------|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| 0 | Ovocito | Ovocito | Ovocito |
| 1 | Larva D veliger | Larva D veliger | Larva D veliger |
| 5 | | | Pediveliger |
| 8 | | Pediveliger | Postlarva |
| 15 | Pediveliger | Postlarva | |
| 20 | Postlarva | | |

III.2.6.- Cultivo de postlarvas y semilla

Una vez se observó que más del 50% de las larvas presentaban pie y desaparecía el velo se pusieron a fijar. El paso de la fase natátil larvaria a sésil (postlarva) se realizó en tanques troncocónicos de 500 litros, en cilindros con malla de 150 μm , con una fina capa de arena de grano medio-fino (grano entre 150 y 600 μm). El flujo de agua fue forzado por “air-lift” descendente.

El cambio de agua se realizó con la misma periodicidad que en el cultivo larvario. Para su alimentación se usó la misma dieta de microalgas utilizada durante el cultivo larvario a una ración inicial de 80 células equivalentes μl^{-1} , que se fue incrementando según las necesidades del cultivo.

La semilla (10 mm) se cultivó en tanques rectangulares de 200 litros, con una capa de arena de grano medio-fino (de 150 a 600 μm) en el fondo, de 10 cm de espesor. Los tanques estaban en circuito abierto, con un flujo de agua de 18 litros hora⁻¹ y con aireación. La temperatura durante la experiencia se mantuvo en $18\pm 1^\circ\text{C}$ y la salinidad en torno a 32-35‰.

La dieta suministrada a la semilla estaba compuesta por: *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans*, *P. tricornutum* y *S. costatum* en proporciones iguales.

III.2.6.1.- Recogida de muestras y control biométrico

Para el seguimiento del crecimiento y supervivencia en la fase de postlarvas y de semilla (semillero) se muestrearon estos estadios según lo descrito en la tabla III.2, debido a la distinta duración del período larvario entre especies. A partir del mes de vida

se determinó la longitud y altura de un mínimo de 50 individuos cada 10-15 días. Al principio, debido a su pequeño tamaño, se midieron con una lupa acoplada a un analizador de imagen (PC Image) y posteriormente, con un calibre digital Mitutoyo (0,01 mm de resolución).

En la fase de postlarvas hasta 1 mes de vida, se determinó el peso seco recogiendo 6 muestras por cultivo y lavando las sales con formiato amónico al 3%. Posteriormente las muestras se liofilizaron, se mantuvieron en desecador durante 1 hora y se determinó el peso seco en balanza de precisión Sartorius MC 210S (D.E.=0,01 mg). Una vez que la semilla alcanzó un tamaño adecuado para su manipulación, se comenzó a estudiar el peso fresco de los individuos, usando para ello una balanza de precisión GRAM Precission ST 3100 (D.E.=0,01 g).

Tabla III.2. Días de recogida de muestra en el cultivo postlarvario para cada especie (coloreado de amarillo). Postl.: postlarva recién fijada.

| Días | <i>Ensis arcuatus</i> | <i>Ensis siliqua</i> | <i>Solen marginatus</i> |
|-------|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| 8 | | | Postl. |
| 15 | | Postl. | |
| 20-22 | Postl. | | |
| 30 | | | |

De los tres cultivos larvarios de *Ensis arcuatus* y *E. siliqua* a partir del mes de vida sólo se ha seguido un cultivo de semilla para cada especie.

III.2.7.- Siembra y cultivo en el medio natural

Cuando la semilla de longueirón vello (*S. marginatus*), mantenida en el semillero, alcanzó un talla aproximada de 20 mm (4 meses de edad) se trasladó a un banco natural. Se sembró en jaulas fabricadas con varilla de acero inoxidable de 8 mm de diámetro, con un área de 50 x 50 cm y altura de 50 cm, cubiertas de malla de 2 mm de luz. Las jaulas se enterraron en el sustrato de forma que sobresaliesen 5 cm del nivel del terreno y se cubrieron, en su parte superior, por una malla plástica de 2 mm de luz, para evitar el desplazamiento de los individuos y la entrada de depredadores (Fig. III.2).

A finales de agosto de 2004 se colocaron 6 jaulas con semilla procedente de criadero en un banco de arena en el intermareal de la Ría de Ribadeo. La situación en el

banco intermareal permitió una correcta accesibilidad, para tener un adecuado control de la experiencia durante el período en que las jaulas quedan al descubierto. Para ello, la situación de las jaulas se ubicó en un lugar con mareas bajas inferiores a 0,5 m de bajamar mínima viva equinocial (B.M.V.E.). La densidad de siembra fue de 400 individuos m⁻².

Cada mes, durante las mareas vivas, consecutivamente una de las jaulas se vaciaba manualmente (por orden, de la número 1 a la 6, y una vez se muestrearon todas, se comienza de nuevo por la primera, hasta llegar a la talla comercial). El objeto de los controles fue recoger a los individuos sin dañarlos y poder determinar crecimiento (longitud, altura y peso) y supervivencia. Para ello se utilizó un calibre digital Mitutoyo (0,01 mm de resolución) y una balanza Scaltec SAS-62 (D.E.=0,1 g). Posteriormente, se devolvieron a la jaula correspondiente. El resto de las jaulas se abrieron, limpiaron y se retiraron los depredadores.



Fig. III.2.a. Jaulas enterradas en el sustrato, utilizadas para la siembra y control de la semilla de *S. marginatus*. b. Semilla dispuesta en una jaula en el momento de siembra.

III.2.7.1.- Control de los parámetros ambientales del medio

Los datos ambientales de temperatura y salinidad se midieron diariamente desde septiembre de 2004 hasta agosto de 2007 en la Ría de Ribadeo, en un lugar próximo a la localización de las jaulas. Los datos de clorofila “a” se corresponden con datos recogidos semanalmente por el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Marino de Galicia (INTECMAR) de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos y fueron cedidos para la realización de este estudio.

III.2.8.- Desoves procedentes del longueirón vello (*Solen marginatus*) cultivado en jaulas

Una vez los individuos han alcanzado la talla comercial y coincidiendo con las mareas vivas de mayo, junio y julio de 2007, se recogieron los ejemplares muestreados en cada jaula y se trasladaron al criadero. Los ejemplares se dispusieron según lo descrito en el apartado III.2.3.1. Las puestas obtenidas se siguieron de tal forma que permitiese obtener semilla, a partir de la puesta inicialmente obtenida en criadero tres años antes, para cerrar el ciclo de cultivo.

III.2.9.- Representación de datos y análisis estadístico

III.2.9.1.- Cultivo larvario

Los datos de crecimiento en longitud y peso se expresan como media junto a la desviación estándar.

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS® para Windows versión 13.0. En todas las comparaciones de medias se intentó agrupar los datos en los siguientes grupos: ovocito, larva D, pediveliger y postlarva (justo después de la fijación).

La comparación de los pesos secos de los estadios larvarios entre especies se ha realizado con tests no paramétricos debido: al tamaño muestral, al incumplimiento por parte de algunos grupos de datos de la distribución normal y que no presentaron homogeneidad de varianzas. Para el contraste de más de dos muestras se aplicó el test H de Kruskal-Wallis y para el contraste dos a dos se usó el test de contraste de dos muestras independientes U de Mann-Whitney.

Para la comparación de las supervivencias en determinados estadios larvarios, y para evitar trabajar con porcentajes, los valores se transformaron según la transformación angular, con una función arcoseno (Sokal & Rohlf, 1995). La función arcoseno estira las colas de la distribución de porcentajes y comprime el medio. Una vez transformados los datos, las medias se compararon mediante el test U de Mann-Whitney.

Las longitudes de los distintos estadios larvarios (ovocito, larva D veliger, pediveliger y postlarva) se han comparado mediante un test de análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para el estudio de la normalidad. La homogeneidad de varianzas se ha comprobado mediante el test de Barlett. Las comparaciones múltiples se han llevado a cabo mediante el test de comparación múltiple de rango (test de Tukey).

Se utilizan los siguientes símbolos para referirse al nivel de significación:

| | |
|---------------------------------|---|
| n.s. = $p \geq 0,050$ | diferencias no significativas |
| * = $0,010 < p < 0,050$ | diferencias significativas al nivel del 95% |
| ** = $0,001 < p < 0,010$ | diferencias altamente significativas al nivel del 99% |

Para el estudio de la asociación entre parámetros se utilizó el coeficiente de correlación por rangos de Spearman (Zar, 1996).

III.2.9.2.- Cultivo de postlarvas y semilla

Durante la fase de postlarva y semilla, los datos de crecimiento en longitud y peso, se expresan como media junto a la desviación estándar.

Los parámetros biométricos, longitud y peso de la semilla, al mes y tres meses de vida, se han comparado mediante un test de análisis de varianza (ANOVA). Se utilizó el test de Kolmogorov-Smirnov para el estudio de la normalidad. La homogeneidad de varianzas se ha comprobado mediante el test de Barlett. Las comparaciones múltiples se han llevado a cabo mediante el test de comparación múltiple de rango (test de Tukey).

III.3.- RESULTADOS

III.3.1.- Acondicionamiento

III.3.1.1.- Navaja (*Ensis arcuatus*)

III.3.1.1.1.- 1ª experiencia (desde reposo gonadal)

Desde el inicio en julio, el Índice de Condición Gonadal (I.C.G.) aumentó ligeramente hasta el muestreo de septiembre, coincidiendo con el período en que una mayor proporción de individuos se encontraban en post-puesta (EV) (Fig. III.3 y III.4). En principio la experiencia se había diseñado para empezar desde reposo, pero los resultados del muestreo inicial revelaron que sólo el 20% de los individuos se encontraban en reposo (E0). A partir del segundo mes hasta el muestreo final (4 meses), el I.C.G. comenzó a aumentar progresivamente. Analizando el I.C.G. por sexos se ve que en el inicio es más elevado que el índice general. A partir del muestreo de septiembre, fue superior en los machos. Por el contrario, el Índice de Condición de la Glándula Digestiva (I.C.D.) descendió hasta octubre y recuperó en noviembre los valores iniciales, siempre con valores más elevados que en el caso del I.C.G.

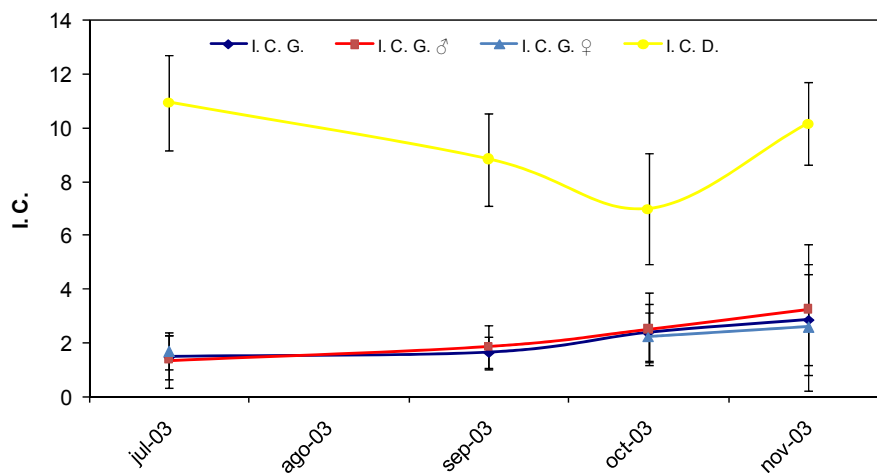


Fig. III.3. Evolución de los Índices de Condición de *E. arcuatus* en el acondicionamiento desde reposo gonadal. I.C.G.: Índice de Condición Gonadal; I.C.G. ♂.: en machos; I.C.G. ♀.: en hembras; I.C.D.: de la Glándula Digestiva.

Al comienzo de la experiencia el 70% de los ejemplares se encontraban en post-puesta (EV) y sólo el 20% en reposo gonadal (E0) (Fig. III.4). En octubre descendió la proporción de individuos que se encontraban en reposo gonadal, aumentando los individuos en gametogénesis inicial y apareciendo un 10% en gametogénesis avanzada

(EII). Tras 4 meses un 60% de los individuos estaban en EII y un 25% en madurez (EIII).

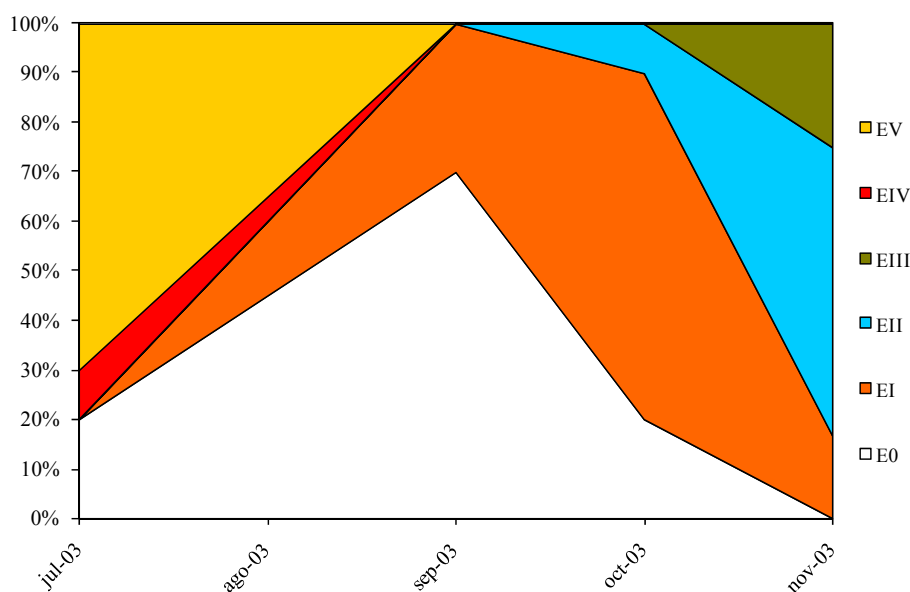


Fig. III.4. Estadios gametogénicos de *E. arcuatus* acondicionado desde reposo gonadal.

III.3.1.1.2.- 2ª experiencia (desde inicio de la gametogénesis)

Todos los I.C.G. se elevaron a lo largo del período estudiado (Fig. III.5). En el inicio de la experiencia el I.C.G. en machos fue más elevado que en hembras y hasta el control final, esta diferencia aumenta. El I.C.D. se mantuvo a lo largo del acondicionamiento.

En el control inicial, el 60% de los individuos se encontraban en gametogénesis inicial (EI) y el resto, en gametogénesis avanzada (EII) (Fig. III.6). En el control intermedio se reparten a partes iguales entre EII y EIII (madurez). Al cabo de 60 días el 70% de los individuos se encontraban en madurez (EIII) y un 30% en puesta (EIV).

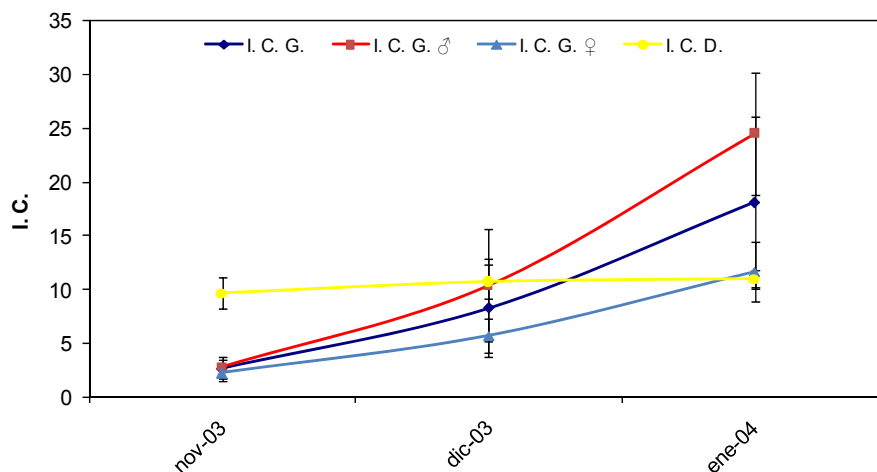


Fig. III.5. Evolución de los Índices de Condición de *E. arcuatus* en el acondicionamiento desde inicio de la gametogénesis. I.C.G.: Índice de Condición Gonadal; I.C.G. ♂: en machos; I.C.G. ♀: en hembras; I.C.D.: de la Glándula Digestiva.

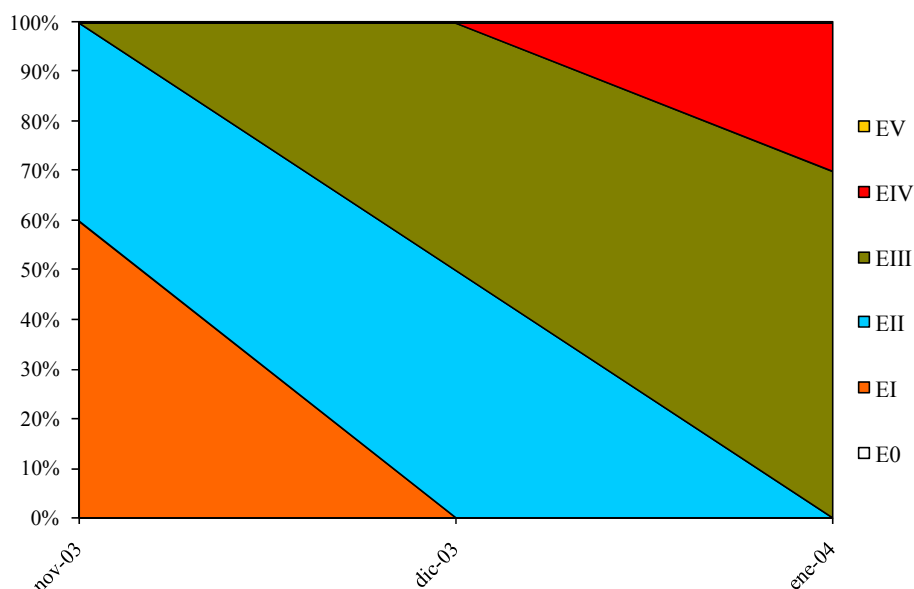


Fig. III.6. Estadios gametogénicos de *E. arcuatus* acondicionado desde inicio de la gametogénesis.

III.3.1.1.3.- 3ª experiencia (desde gametogénesis avanzada)

Los I.C.G. siguieron una tendencia de aumentos en los distintos controles realizados (Fig. III.7). En los controles inicial y final, el I.C.G. era superior en machos que en hembras, mientras que en el intermedio la tendencia se invirtió. El I.C.D. disminuyó ligeramente a lo largo del acondicionamiento, con valores mínimos en el control inicial.

En el control inicial, la mayoría de los ejemplares se encontraban en gametogénesis avanzada (EII) (55%), seguido por individuos en inicio (EI) y una pequeña parte en reposo (E0) (Fig. III.8). En el siguiente control, la mayoría de la población estudiada se encontraba en EII, apareciendo ya un 30% en madurez (EIII). Al final del estudio (54 días), la mitad de ejemplares se encontraban aún en EII y el resto ya estaban en EIII (madurez).

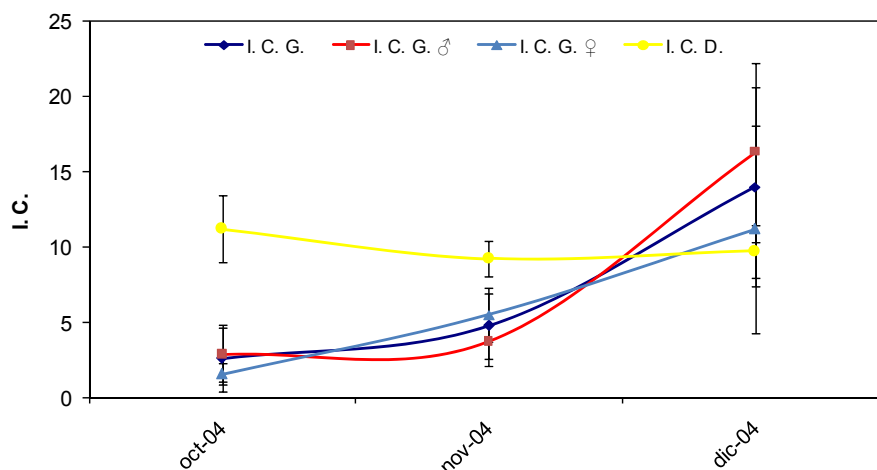


Fig. III.7. Evolución de los Índices de Condición de *E. arcuatus* en el acondicionamiento desde gametogénesis avanzada. I.C.G.: Índice de Condición Gonadal; I.C.G. ♂.: en machos; I.C.G. ♀.: en hembras; I.C.D.: de la Glándula Digestiva.

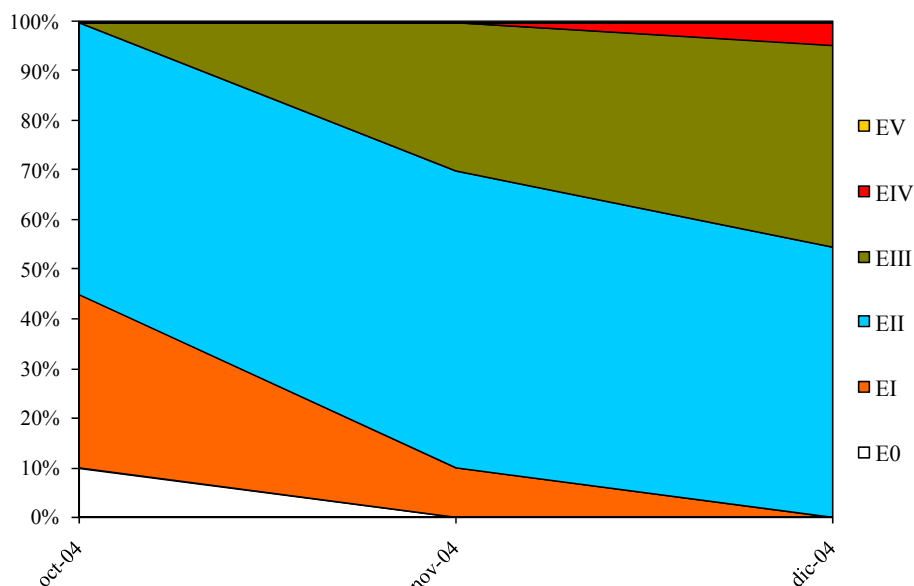


Fig. III.8. Estadios gametogénicos de *E. arcuatus* acondicionado desde gametogénesis avanzada.

III.3.1.2.- Longueirón (*Ensis siliqua*)

III.3.1.2.1.- 1ª experiencia (desde reposo gonadal)

El I.C.G. aumentó poco durante los primeros meses, siendo bajo hasta diciembre, sin poder diferenciarse el sexo de los ejemplares, bien macroscópicamente o por métodos histológicos (Fig. III.9). A partir de este momento, los valores se elevaron alcanzando el máximo en abril. Los I.C.G. por sexos siguieron tendencias opuestas siendo menor en marzo en las hembras y superior en abril, mes en el que se produjo un descenso acusado en los machos. Por su parte, el I.C.D. siguió una tendencia ligeramente descendente a lo largo de los meses de estudio, pero no constante.

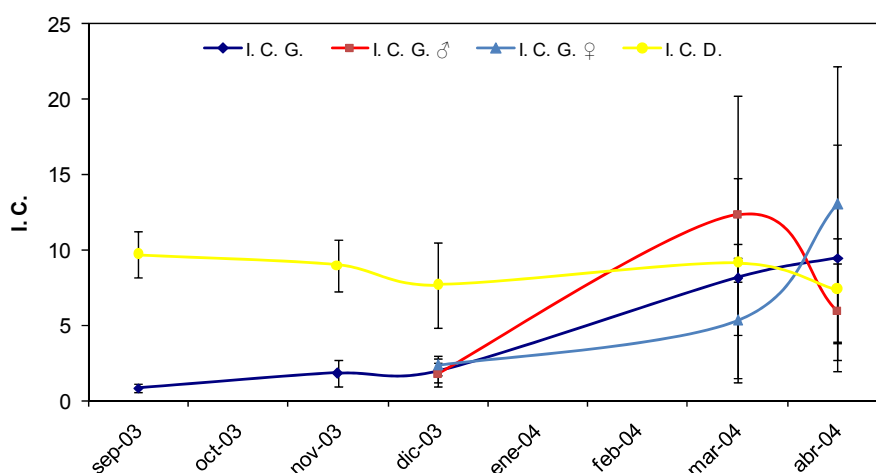


Fig. III.9. Evolución de los Índices de Condición de *E. siliqua* en el acondicionamiento desde reposo gonadal; I.C.G.: Índice de Condición Gonadal; I.C.G. ♂.: en machos; I.C.G. ♀.: en hembras; I.C.D.: de la Glándula Digestiva.

En el control inicial todos los individuos se encontraban en reposo (E0), llegando tras 60 días (diciembre) a estar todos en gametogénesis inicial (Fig. III.10). En marzo (120 días) casi la mitad estaban en gametogénesis avanzada y el resto se encontraban en madurez (35%) y puesta (18%). Al final del acondicionamiento (180 días) el 63% estaban en madurez y el resto en desove.

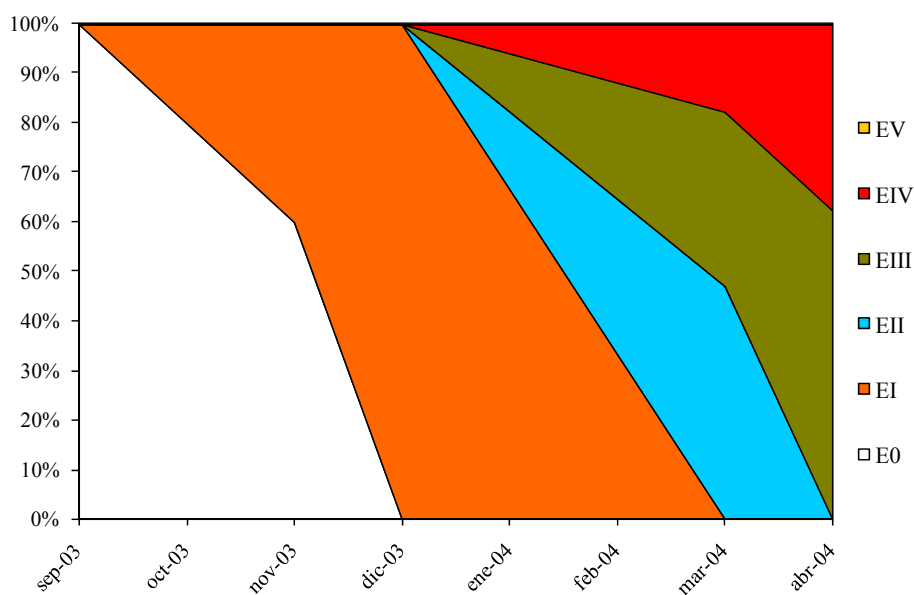


Fig. III.10. Estadios gametogénicos de *E. siliqua* acondicionado desde reposo gonadal.

III.3.1.2.2.- 2ª experiencia (desde inicio de la gametogénesis)

Tras 30 días de acondicionamiento el I.C.G. aumentó ligeramente, alcanzando el máximo en mayo (tras 90 días) y descendiendo en junio (120 días) (Fig. III.11). Mientras el I.C.G. en machos siguió el mismo patrón que el I.C.G. sin diferenciación por sexos, el de las hembras alcanzó el máximo valor a los 120 días de acondicionamiento. El I.C.D. alcanzó un máximo a los 30 días, para posteriormente descender hasta mayo (90 días) y recuperarse levemente al final (120 días).

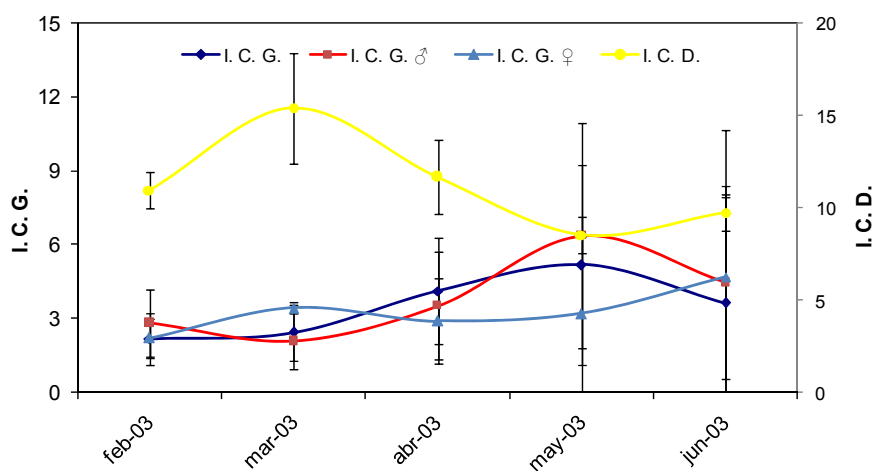


Fig. III.11. Evolución de los Índices de Condición de *E. siliqua* en el acondicionamiento desde inicio de la gametogénesis. I.C.G.: Índice de Condición Gonadal; I.C.G. ♂: en machos; I.C.G. ♀: en hembras; I.C.D.: de la Glándula Digestiva.

Al inicio de la experiencia toda la población se encontraba en gametogénesis inicial, madurando hasta alcanzar en el siguiente control gametogénesis avanzada (90%) (Fig. III.12). En el muestreo de abril (60 días), la mayoría de los ejemplares estaba en madurez y desove (67% y 22%, respectivamente). En mayo y junio (154 y 204 días, respectivamente) progresivamente aumentaron los estadios de puesta y posteriormente, post-puesta.

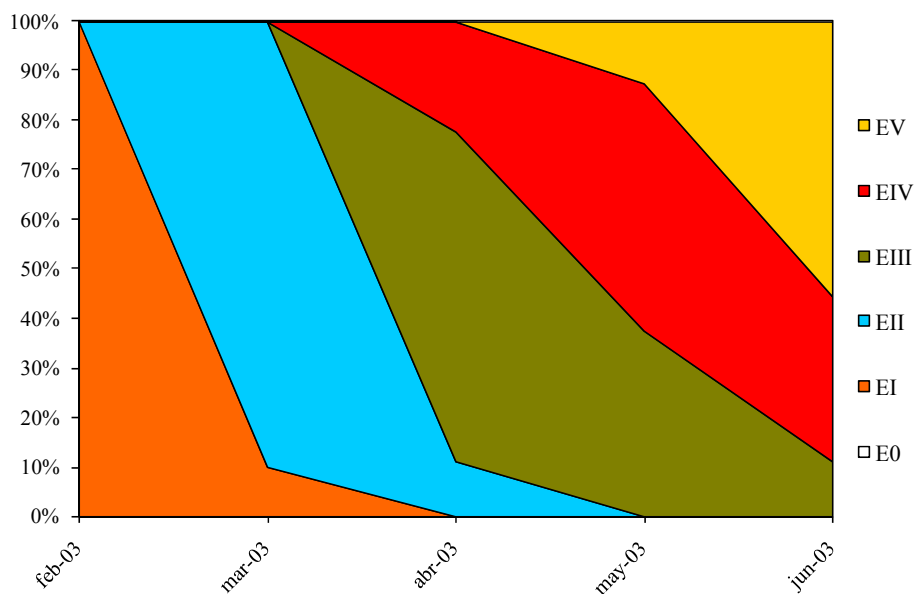


Fig. III.12. Estadios gametogénicos de *E. siliqua* acondicionado desde inicio de la gametogénesis.

III.3.1.2.3.- 3ª experiencia (desde gametogénesis avanzada)

Los I.C.G. aumentaron ligeramente durante el primer mes, presentando un incremento importante al final del acondicionamiento (60 días) (Fig. III.13). El I.C.D. permaneció estable a lo largo del período de estudio.

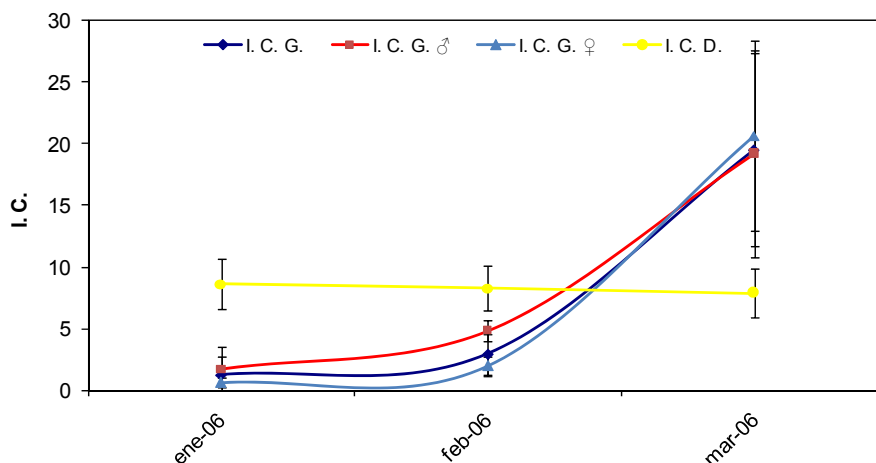


Fig. III.13. Evolución de los Índices de Condición de *E. siliqua* en el acondicionamiento desde gametogénesis avanzada. I.C.G.: Índice de Condición Gonadal; I.C.G. ♂: en machos; I.C.G. ♀: en hembras; I.C.D.: de la Glándula Digestiva.

Al inicio de la experiencia, el 70% de los individuos se encontraban en gametogénesis avanzada, manteniéndose este porcentaje tras un mes y apareciendo el 22% de los individuos en madurez (EIII) (Fig. III.14). Tras dos meses de acondicionamiento, el 80% de los ejemplares estaban en estadio de madurez.



Fig. III.14. Estadios gametogénicos de *E. siliqua* acondicionado desde gametogénesis avanzada.

III.3.1.3.- Longueirón vello (*Solen marginatus*)

III.3.1.3.1.- 1ª experiencia (desde reposo gonadal)

El I.C.G. permaneció muy bajo hasta el muestreo de marzo (120 días), elevándose entre marzo y abril (Fig. III.15). El I.C.G. en hembras fue superior al de los machos en los dos meses que se pudo realizar la identificación del sexo. El I.C.D. se elevó progresivamente a lo largo del período estudiado.

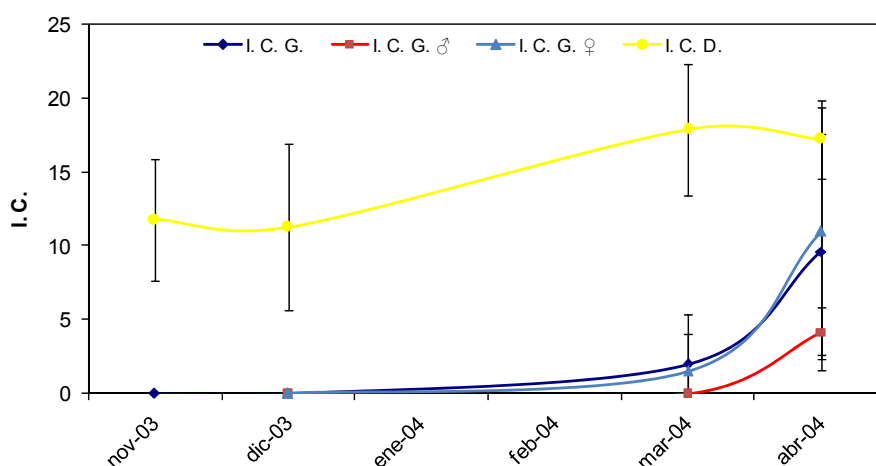


Fig. III.15. Evolución de los Índices de Condición de *S. marginatus* en el acondicionamiento desde reposo gonadal; I.C.G.: Índice de Condición Gonadal; I.C.G. ♂.: en machos; I.C.G. ♀.: en hembras; I.C.D.: de la Glándula Digestiva.

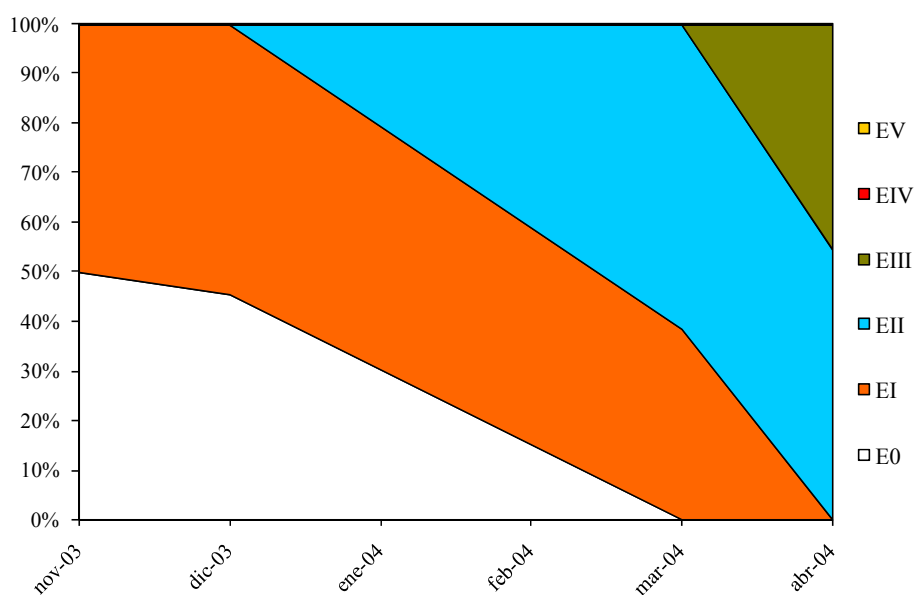


Fig. III.16. Estadios gametogénicos de *S. marginatus* acondicionado desde reposo gonadal.

Al inicio de la experiencia la mitad de los ejemplares se encontraban en reposo y la otra mitad, en gametogénesis inicial (Fig. III.16). En el muestreo de marzo (120 días) el 62% ya se encontraban en gametogénesis avanzada y en abril (150 días) en gametogénesis avanzada y madurez, 54% y 46%, respectivamente.

III.3.1.3.2.- 2ª experiencia (desde gametogénesis avanzada)

El I.C.G. se elevó desde 0,95 hasta 13,72 en los 38 días de estudio, observándose un mayor aumento del I.C.G. en machos que en hembras (Fig. III.17). A su vez, el I.C.D. aumentó.

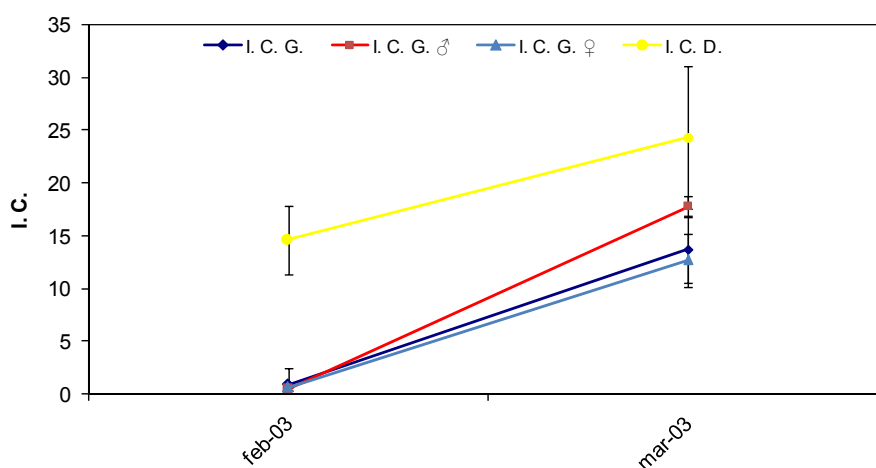


Fig. III.17. Evolución de los Índices de Condición de *S. marginatus* en el acondicionamiento desde gametogénesis avanzada. I.C.G.: Índice de Condición Gonadal; I.C.G. ♂.: en machos; I.C.G. ♀.: en hembras; I.C.D.: de la Glándula Digestiva.

En el control inicial el 80% de los individuos muestreados se encontraban en gametogénesis avanzada (Fig. III.18). A los 38 días de estudio la mayoría se encontraba en madurez y puesta, 60% y 20%, respectivamente.

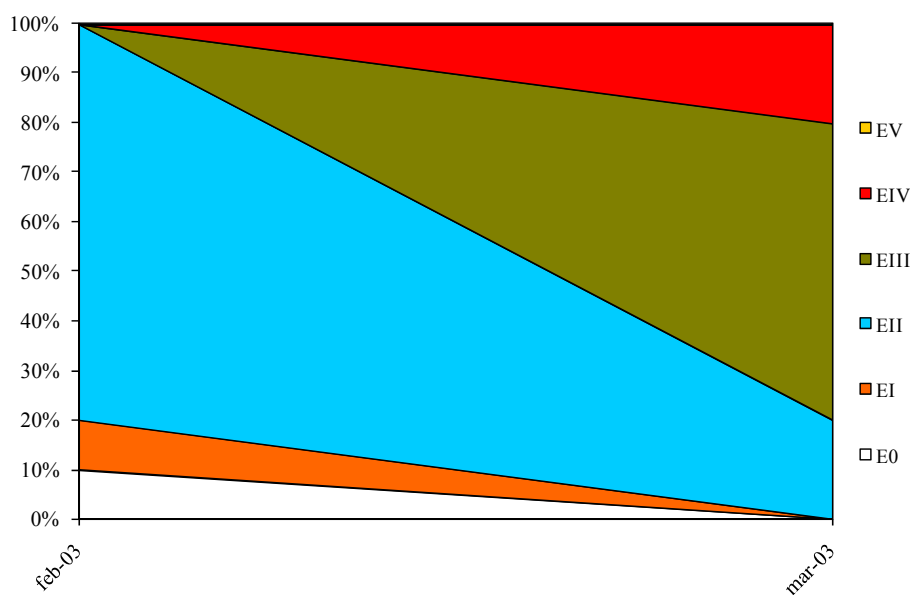


Fig. III.18. Estadios gametogénicos de *S. marginatus* acondicionado desde gametogénesis avanzada.

III.3.2.- Inducción a la puesta

III.3.2.1.- Navaja (*Ensis arcuatus*)

Los adultos de *Ensis arcuatus* procedentes del medio natural, desovan en el criadero desde enero hasta mayo, siendo éste el período en que se encuentran maduros en el medio natural. Induciendo la puesta no se obtuvo respuesta empleando el choque térmico, ni raspando las gónadas ni con agua tratada con ultravioleta. El único estímulo efectivo que promovió la puesta fue el cambio de niveles de agua, con breves períodos de desecación, tras dos horas desde el comienzo de la inducción. En este experimento de un total de 25 individuos desovaron 6 hembras y varios machos, liberando cada hembra alrededor de un millón de huevos. Las hembras al liberar los gametos lo hacían a pulsos, parando unos instantes, antes de reanudar la puesta, hasta un total de cuatro veces. Los ovocitos tenían un aspecto de una nube de puntos blanquecina en el momento de la emisión, durando el desove, aproximadamente una hora. Los espermatozoides al ser emitidos aparecen como un hilo, y en poco tiempo el agua adquiere un aspecto blanquecino.

Los desoves que se obtuvieron en esta experiencia se utilizaron para el estudio de la embriología y desarrollo larvario en *E. arcuatus* (Capítulo II). Además, con este método se obtuvieron los tres desarrollos larvarios seguidos en este capítulo.

III.3.2.2.- Longueirón (*Ensis siliqua*)

Los adultos de longueirón se encuentran maduros en el medio natural durante los meses de mayo y junio. En esta época a los reproductores traídos del medio natural se les aplicaron los distintos métodos de inducción a la puesta, siendo el único método efectivo, el choque térmico. Los machos emitían gametos formando una densa nube en la columna de agua. Las hembras emitieron gametos de una forma discontinua, durando el desove aproximadamente una hora, tiempo en el que los ovocitos liberados aparecen agrupados y se observan como puntos blanquecinos en la columna de agua.

III.3.2.3.- Longueirón vello (*Solen marginatus*)

Con el longueirón vello se realizaron numerosas pruebas con los diferentes estímulos para la inducción a la puesta, sin conseguir respuesta alguna. Tras la inducción por choque térmico se suele obtener una puesta al día siguiente en el mismo tanque en que se realiza. Los huevos al dividirse presentan una coloración marrón.

III.3.3.- Cultivo de larvas

III.3.3.1.- Navaja (*Ensis arcuatus*)

La tabla III.3 muestra los datos de supervivencia, respecto a la fecundación y a la larva D veliger recién transformada, durante el desarrollo embrionario y larvario de las larvas de *Ensis arcuatus* cultivadas en criadero, y el número de ovocitos liberados por puesta. La supervivencia, desde la fertilización hasta el estadio de larva D veliger recién transformada, fue alta (entre el 80-81%), a excepción del cultivo P-2 en el que sólo llegaron a larva D el 23% de los huevos fertilizados. Las supervivencias al final del cultivo larvario, a postlarva recién metamorfoseada, variaron entre el 4,9% en P-2 (ya en larva D, ésta fue baja) y el 24,8%. Por el contrario, analizando los datos de supervivencia calculados a partir del número inicial de larvas D recién transformadas, se puede observar como P-2 es la puesta que presentaba una menor supervivencia (14,7%), aunque fueron muy similares entre desarrollos. El tamaño de las puestas varió entre los 5,0 y los 11,4 millones de ovocitos, siendo la puesta de mayor tamaño la que presentó menor viabilidad larvaria (P-2). Al tratarse de un número elevado de ovocitos pudo haber problemas de anoxia debido a la alta densidad presente.

Tabla III.3. Número de ovocitos liberados por puesta y valores de supervivencia (%) durante el desarrollo larvario de *E. arcuatus*, referidos al número inicial de ovocitos y de larvas D recién transformadas.

| Puesta | Nº Ovocitos | Día 0 (ovocito) | Día 1 (larva D) | Día 8 | Día 15 (pediveliger) | Día 20 (postlarva) |
|-------------------|-------------|--------------------|--------------------|-------|-------------------------|-----------------------|
| P-1 Feb.- 2004 | 4.960.000 | 100 | 81,77 | 30,11 | 21,61 | 17,00 |
| | - | - | 100 | 33,23 | 21,19 | 15,01 |
| P-2 Mar.- 2004 | 11.380.000 | 100 | 23,49 | 9,69 | 5,25 | 4,86 |
| | - | - | 100 | 36,84 | 16,49 | 14,73 |
| P-3 Feb.-2005 | 5.940.000 | 100 | 80,84 | 56,36 | 33,87 | 24,84 |
| | - | - | 100 | 62,25 | 30,43 | 17,05 |

La figura III.19 representa los datos medios y sus correspondientes rectas de regresión del crecimiento en longitud a lo largo del desarrollo larvario en tres cultivos diferentes realizados desde febrero de 2004. Como se observa, el crecimiento larvario siguió un modelo lineal con un coeficiente de ajuste alto ($R^2 > 0,95$). En el paso de ovocito a larva D existe un incremento importante en la talla puesto que el ovocito es esférico y al formarse la concha en la larva D, ésta presenta una longitud mayor que altura. Cabe destacar también la mayor variabilidad en el crecimiento en longitud en la pediveliger (día 15) y postlarva (día 20), debido a las características morfológicas de la navaja (alargamiento de la concha), lo que aumentó la dispersión de tallas entre individuos. El crecimiento diario en longitud osciló entre 11,9 y 14,1 $\mu\text{m día}^{-1}$ a lo largo del desarrollo.

Tabla III.4. Longitudes del ovocito (día 0) y de las larvas (L , μm ; $n=50$) y pesos secos ($P.S.$, $\mu\text{g ind.}^{-1}$; $n=6$) mostrados en valores medios y desviación estándar ($D.E.$) en diferentes momentos del desarrollo larvario de tres puestas diferentes de *E. arcuatus*. Dpf: días post-fertilización.

| Dpf | Feb.- 2004 P-1 | | Mar.- 2004 P-2 | | Feb.- 2005 P-3 | |
|-----|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|-------------------|
| | $L \pm D.E.$ | $P.S. \pm D.E.$ | $L \pm D.E.$ | $P.S. \pm D.E.$ | $L \pm D.E.$ | $P.S. \pm D.E.$ |
| 0 | 70,78 \pm 5,78 | 0,148 \pm 0,019 | 90,34 \pm 6,28 | 0,108 \pm 0,004 | 76,57 \pm 5,51 | 0,166 \pm 0,008 |
| 1 | 121,69 \pm 8,74 | 0,385 \pm 0,117 | 125,26 \pm 11,71 | 0,425 \pm 0,051 | 117,74 \pm 8,41 | 0,278 \pm 0,155 |
| 8 | 173,44 \pm 60,96 | 1,166 \pm 0,290 | 205,96 \pm 34,33 | 0,958 \pm 0,054 | 161,06 \pm 23,67 | 0,901 \pm 0,053 |
| 15 | 276,72 \pm 53,51 | 2,471 \pm 0,258 | 311,59 \pm 58,35 | 2,954 \pm 0,151 | 251,41 \pm 35,75 | 2,495 \pm 0,035 |
| 20 | 361,78 \pm 42,07 | 3,261 \pm 0,134 | 382,35 \pm 44,05 | 4,736 \pm 0,540 | 324,84 \pm 95,27 | 6,775 \pm 0,293 |

Los pesos de los ovocitos variaron entre los 0,11 y 0,17 $\mu\text{g ind.}^{-1}$, aumentando ligeramente en la larva D, aunque no haya alimentación durante este período, alcanzando pesos secos entre 0,28 y 0,42 $\mu\text{g ind.}^{-1}$ (Tabla III.4). En P-2 se observaron

los ovocitos mayores, aunque fueron los que menos pesaron, pero en las larvas D se observó que a mayor tamaño hay un mayor peso seco. En el momento de la fijación las postlarvas recién transformadas pesaron entre 3,26 y 6,78 $\mu\text{g ind.}^{-1}$. Los mayores pesos secos en las postlarvas se encontraron en P-3, aunque la longitud media en la fijación fue la menor de los tres cultivos (324,8 μm de longitud y 6,8 $\mu\text{g ind.}^{-1}$ de peso seco).

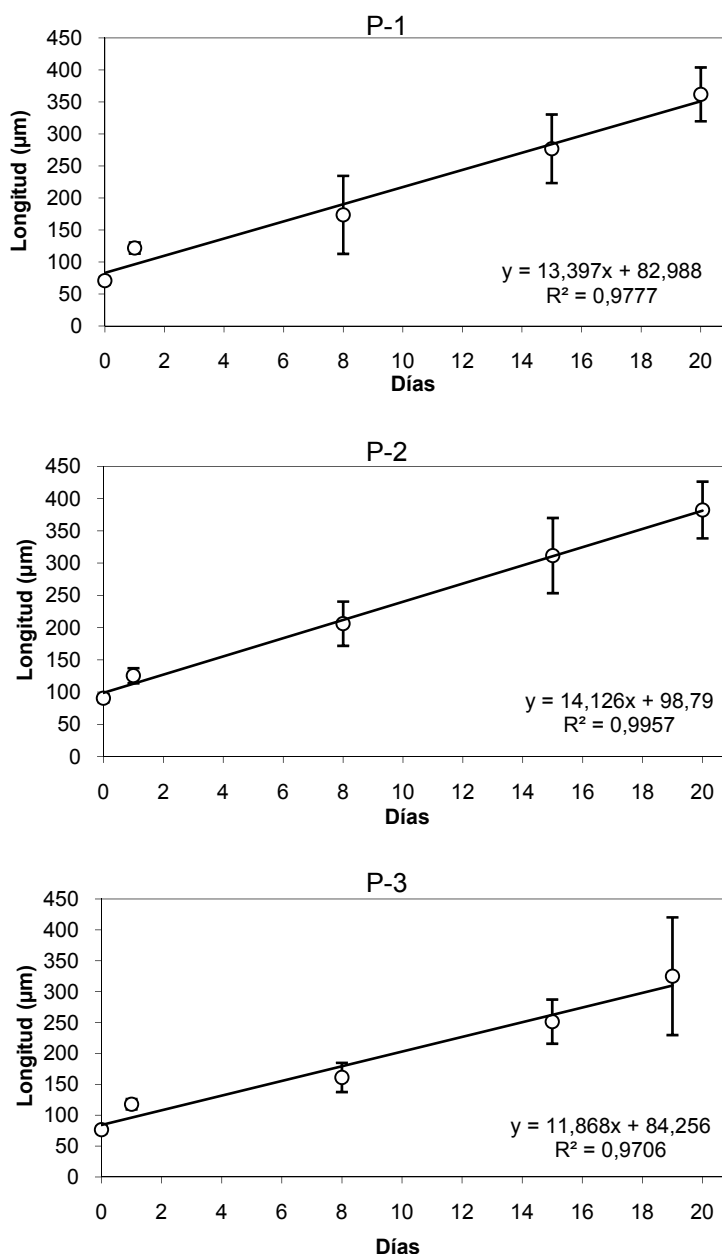


Fig. III.19. Crecimiento en longitud durante el desarrollo larvario de *E. arcuatus*.

Los aumentos de peso seco a lo largo del cultivo se ajustaron en los cultivos P-1 y P-2 a modelos de regresión lineal, mientras en P-3 el peso seco en la pediveliger y sobre todo en la postlarva recién fijada, aumentaron exponencialmente (Fig. III.20).

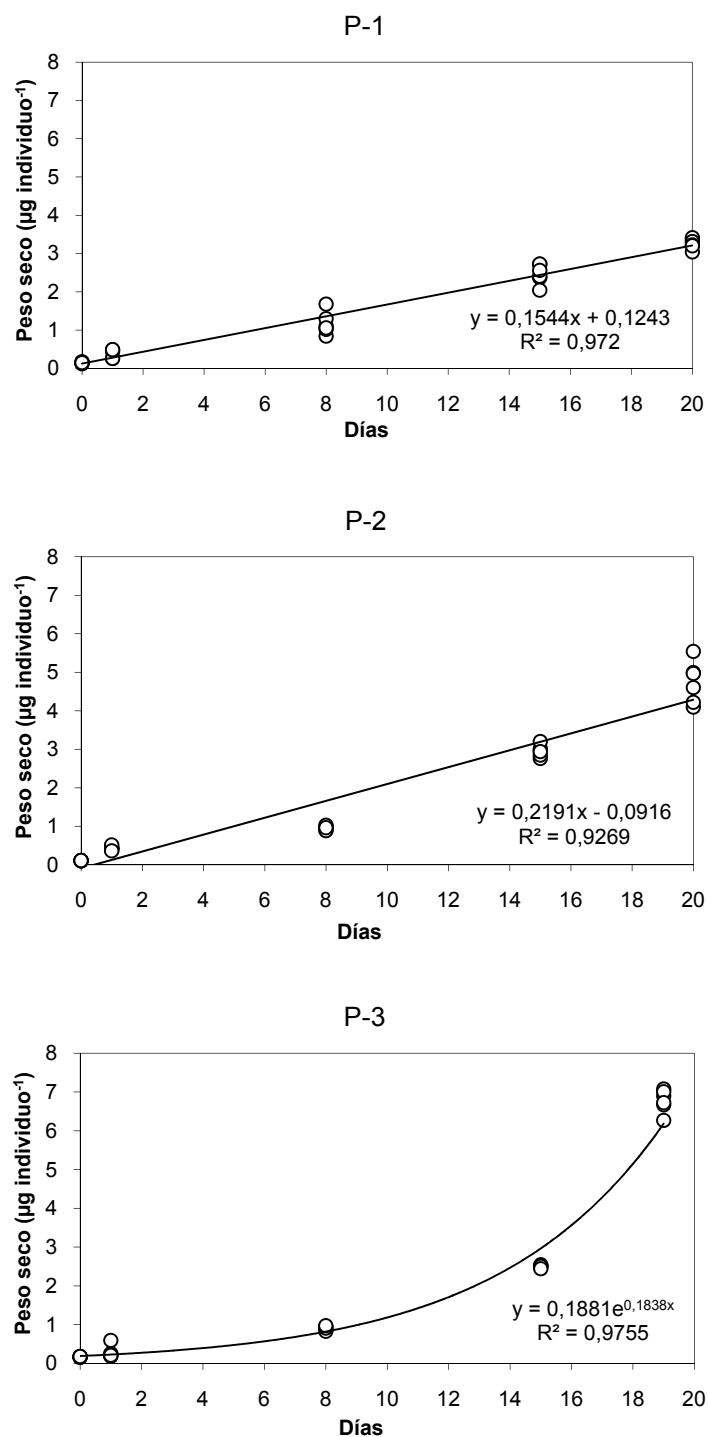


Fig. III.20. Evolución del peso seco total ($\mu\text{g individuo}^{-1}$) a lo largo del desarrollo larvario de *E. arcuatus*. Se presentan las ecuaciones de regresión.

La relación entre crecimiento en longitud y peso seco en los 3 cultivos, siguió un modelo potencial con un coeficiente de ajuste alto ($R^2 > 0,95$) (Fig. III.21).

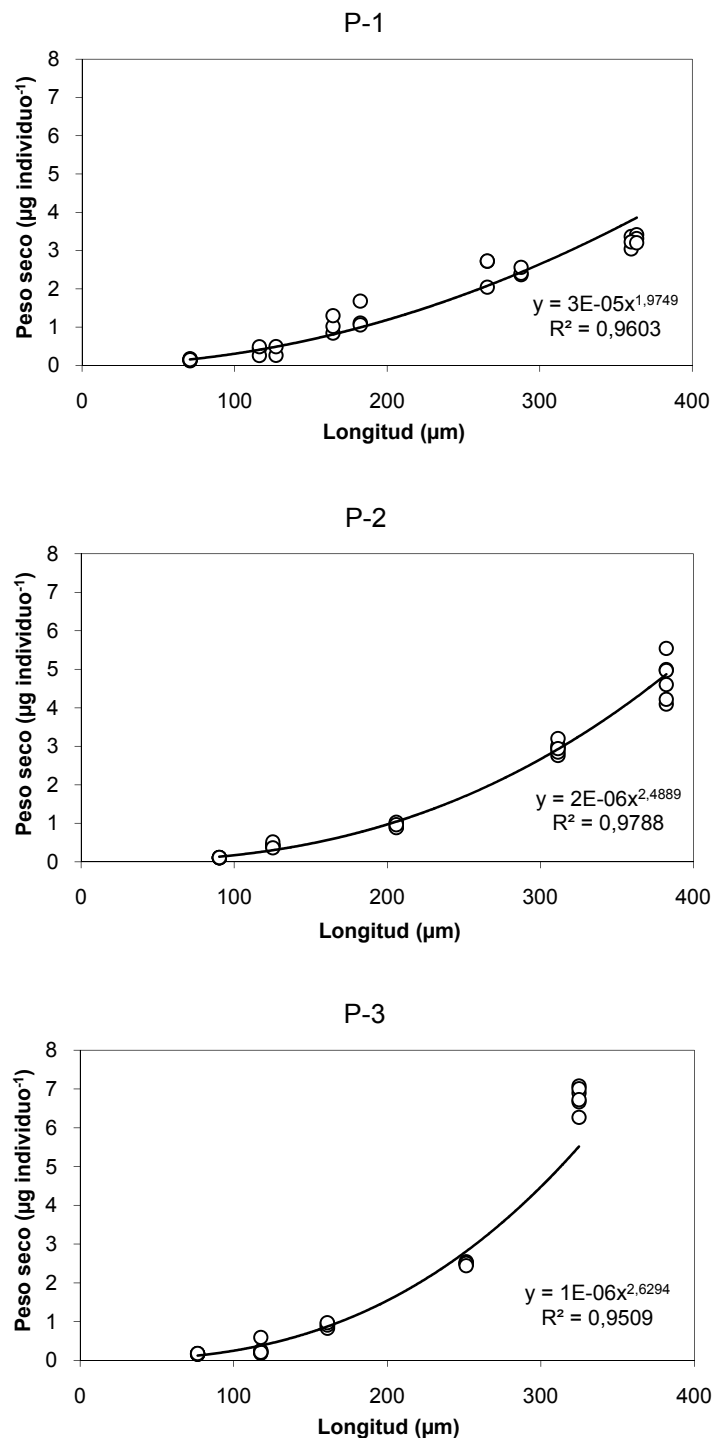


Fig. III.21. Relaciones del peso seco total ($\mu\text{g individuo}^{-1}$) con la longitud (μm) a lo largo del desarrollo larvario de *E. arcuatus*. Se presentan las ecuaciones de regresión.

En la tabla III.5 se presentan datos estadísticos de la correlación de Spearman, estos muestran la relación entre los parámetros biométricos de ovocitos y larvas D (talla y peso seco) y la supervivencia larvaria, lo que nos permite saber qué características de los ovocitos y larvas D son las adecuadas para obtener el máximo rendimiento del

cultivo larvario, medido como la supervivencia alcanzada. En caso de *E. arcuatus*, lo deseable es obtener para el cultivo ovocitos de un tamaño pequeño pero un elevado peso seco, que serían los que maximizarían la supervivencia en la larva D recién transformada y tras todo el desarrollo larvario (fijación). Estos ovocitos darían lugar a larvas D de longitud y peso seco menor que maximizarían la supervivencia embrionaria y larvaria.

Tabla III.5. Coeficiente de Correlación de Spearman entre la supervivencia, el tamaño, peso seco de ovocitos y larvas D recién transformadas en *E. arcuatus*. Sup-LD: supervivencia en la larva D; Sup-Fij: supervivencia en la fijación; L-Hv: diámetro del ovocito; PS-Hv: peso seco del ovocito; L-LD: longitud de la larva D; PS-LD: peso seco de la larva D. **Negrita:** correlación significativa; *: al 95% de confianza; **: al 99% de confianza.

| | Sup-Fij | L-Hv | PS-Hv | L-LD | PS-LD |
|----------------|---------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------|
| Sup-LD | 0,667* | -1,000** | 0,632* | 0,111 | -0,632* |
| Sup-Fij | | -0,667* | 0,949** | -0,667* | -0,949** |
| L-Hv | | | -0,598* | 0,246 | 0,478 |
| PS-Hv | | | | -0,706* | -0,657* |
| L-LD | | | | | 0,324 |

III.3.3.2.- Longueirón (*Ensis siliqua*)

En el caso del longueirón (*E. siliqua*) se muestra el seguimiento de tres cultivos larvarios en el criadero (Tabla III.6). La supervivencia desde fertilización hasta larva D recién transformada fue similar en los tres (entre el 70 y el 80%), descendiendo a lo largo del cultivo mostrando valores en la fijación (día 15) que varían entre 28,4 y 52,7%. Si se sigue la evolución de las supervivencias partiendo desde larva D recién transformada, se puede apreciar la misma evolución que desde ovocito, obteniéndose unos porcentajes algo superiores en la supervivencia desde larva D. El número de ovocitos por puesta varió entre 2,3 y 4,7 millones.

Tabla III.6. Número de ovocitos liberados por puesta y valores de supervivencia (%) durante el desarrollo larvario de *Ensis siliqua*, referidos al número inicial de ovocitos y de larvas D recién transformadas.

| Puesta | Nº Ovocitos | Día 0 (ovocito) | Día 1 (larva D) | Día 8 (pediveliger) | Día 15 (postlarva) |
|---------------------|-------------|--------------------|--------------------|------------------------|-----------------------|
| P-1 May.- 2005 | 3.098.000 | 100 | 70,80 | 40,55 | 28,38 |
| | - | - | 100 | 52,29 | 33,43 |
| P-2 Jun. A- 2005 | 2.252.000 | 100 | 74,11 | 56,07 | 52,69 |
| | - | - | 100 | 75,66 | 56,11 |
| P-3 Jun. B- 2005 | 4.680.000 | 100 | 79,74 | 53,66 | 45,72 |
| | - | - | 100 | 65,21 | 54,61 |

La figura III.22 representa los datos medios con su error estándar y sus correspondientes rectas de regresión del crecimiento en longitud a lo largo del desarrollo larvario, en tres cultivos realizados en mayo y junio de 2005. Existe un ajuste lineal del crecimiento con un coeficiente de ajuste alto en los tres desarrollos ($R^2 > 0,95$). Hay una mayor dispersión de los datos de crecimiento en longitud el día de la fijación, debido a la elongación de la concha. El crecimiento diario fue de 14,0; 14,4 y 18,8 $\mu\text{m día}^{-1}$.

La tabla III.7 muestra los valores medios para longitud ($n=50$) y el peso seco total ($n=6$) en distintos momentos desde la fertilización hasta la fijación a lo largo del desarrollo larvario en los tres cultivos seguidos. Los pesos de los ovocitos variaron entre los 0,13 y 0,20 $\mu\text{g ind.}^{-1}$, presentando los de mayor tamaño mayor peso. En larvas D veliger recién formadas, a las que aún no se había suministrado alimento, el peso seco fue de 0,18 y 0,33 $\mu\text{g ind.}^{-1}$. A pesar de que en P-1 la longitud media de las larvas D fue similar a P-2, su peso seco era prácticamente la mitad. Además, el peso seco de la larva D en P-1 fue similar al de los ovocitos. Tras la metamorfosis las postlarvas pesaron entre 2,59 y 4,06 $\mu\text{g ind.}^{-1}$. La variación entre puestas en el peso seco en las postlarvas fue importante, siendo muy diferente entre P-1 y P-3, aunque las longitudes eran similares.

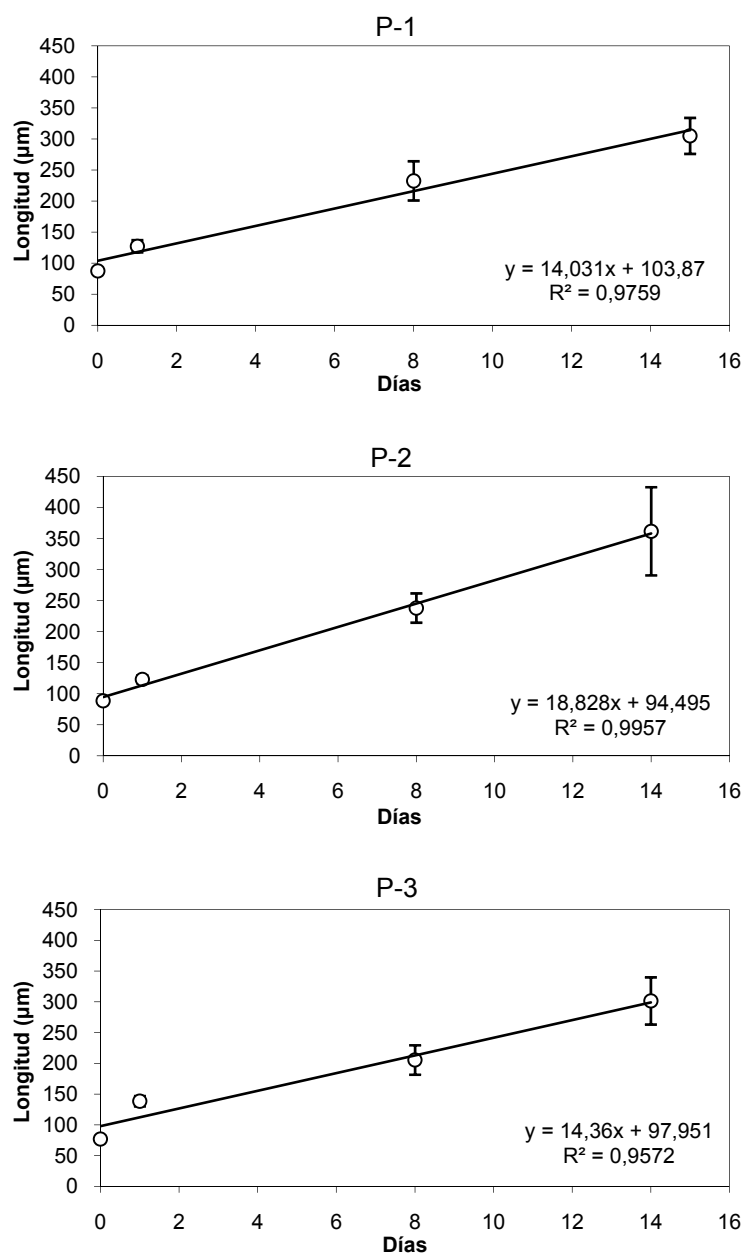


Fig. III.22. Crecimiento en longitud durante el desarrollo larvario de *E. siliqua*.

Tabla III.7. Longitudes del ovocito (día 0) y de las larvas (L, μm ; $n=50$) y pesos secos (P.S., $\mu\text{g ind}^{-1}$; $n=6$) mostrados en valores medios y desviación estándar (D.E.) en diferentes momentos del desarrollo larvario de tres puestas diferentes de *E. siliqua*. Dpf: días post-fertilización.

| Dpf | May.- 2005 P-1 | | Jun. A- 2005 P-2 | | Jun. B- 2005 P-3 | |
|-----|--------------------|-------------------|---------------------|-------------------|---------------------|-------------------|
| | L \pm D.E. | P.S. \pm D.E. | L \pm D.E. | P.S. \pm D.E. | L \pm D.E. | P.S. \pm D.E. |
| 0 | 87,54 \pm 3,53 | 0,164 \pm 0,007 | 88,52 \pm 2,87 | 0,198 \pm 0,018 | 76,89 \pm 3,87 | 0,127 \pm 0,010 |
| 1 | 127,20 \pm 9,79 | 0,175 \pm 0,014 | 123,09 \pm 6,49 | 0,334 \pm 0,089 | 138,44 \pm 8,37 | 0,310 \pm 0,034 |
| 8 | 232,49 \pm 31,57 | 1,778 \pm 0,091 | 237,90 \pm 23,54 | 1,935 \pm 0,134 | 205,38 \pm 23,96 | 1,288 \pm 0,121 |
| 15 | 304,97 \pm 28,97 | 4,063 \pm 0,188 | 361,52 \pm 71,00 | 3,353 \pm 0,253 | 301,39 \pm 38,45 | 2,590 \pm 0,178 |

La evolución de los pesos secos a lo largo del cultivo se ajustó a ecuaciones lineales, produciéndose los mayores incrementos en la pediveliger y postlarva (Fig. III.23).

La relación entre crecimiento en longitud y peso seco en los 3 cultivos se ajustó a ecuaciones potenciales con un coeficiente de ajuste alto ($R^2 > 0,90$) (Fig. III.24).

Según la tabla III.8, a mayor talla y peso seco de las larvas D recién transformadas de *E. siliqua*, se obtendrán mejores supervivencias en la larva D y sólo los mayores pesos secos en la larva D serán capaces de explicar altas supervivencias en la fijación.

Tabla III.8. Coeficiente de Correlación de Spearman entre la supervivencia, el tamaño, peso seco de ovocitos y larvas D recién transformadas en *E. siliqua*. Sup-LD: supervivencia en la larva D; Sup-Fij: supervivencia en la fijación; L-Hv: diámetro del ovocito; PS-Hv: peso seco del ovocito; L-LD: longitud de la larva D; PS-LD: peso seco de la larva D. **Negrita:** correlación significativa; *: al 95% de confianza; **: al 99% de confianza.

| | Sup-Fij | L-Hv | PS-Hv | L-LD | PS-LD |
|----------------|---------|--------|----------------|----------------|----------------|
| Sup-LD | 0,500 | -0,500 | -0,478 | 1,000** | 0,598* |
| Sup-Fij | | 0,500 | 0,478 | 0,500 | 0,837** |
| L-Hv | | | 0,956** | -0,500 | 0,239 |
| PS-Hv | | | | -0,478 | 0,314 |
| L-LD | | | | | 0,598* |

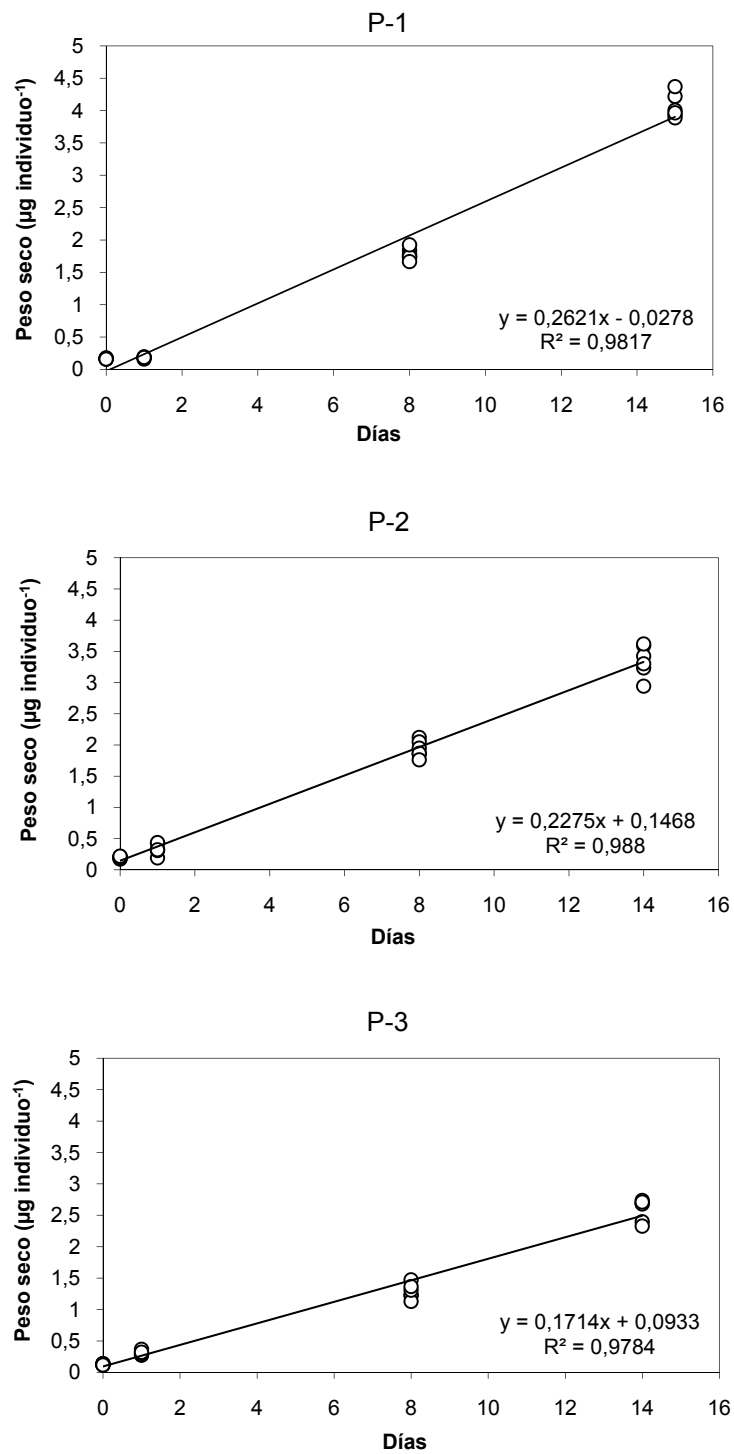


Fig. III.23. Evolución del peso seco total ($\mu\text{g individuo}^{-1}$) a lo largo del desarrollo larvario de *E. siliqua*. Se presentan las ecuaciones de regresión.

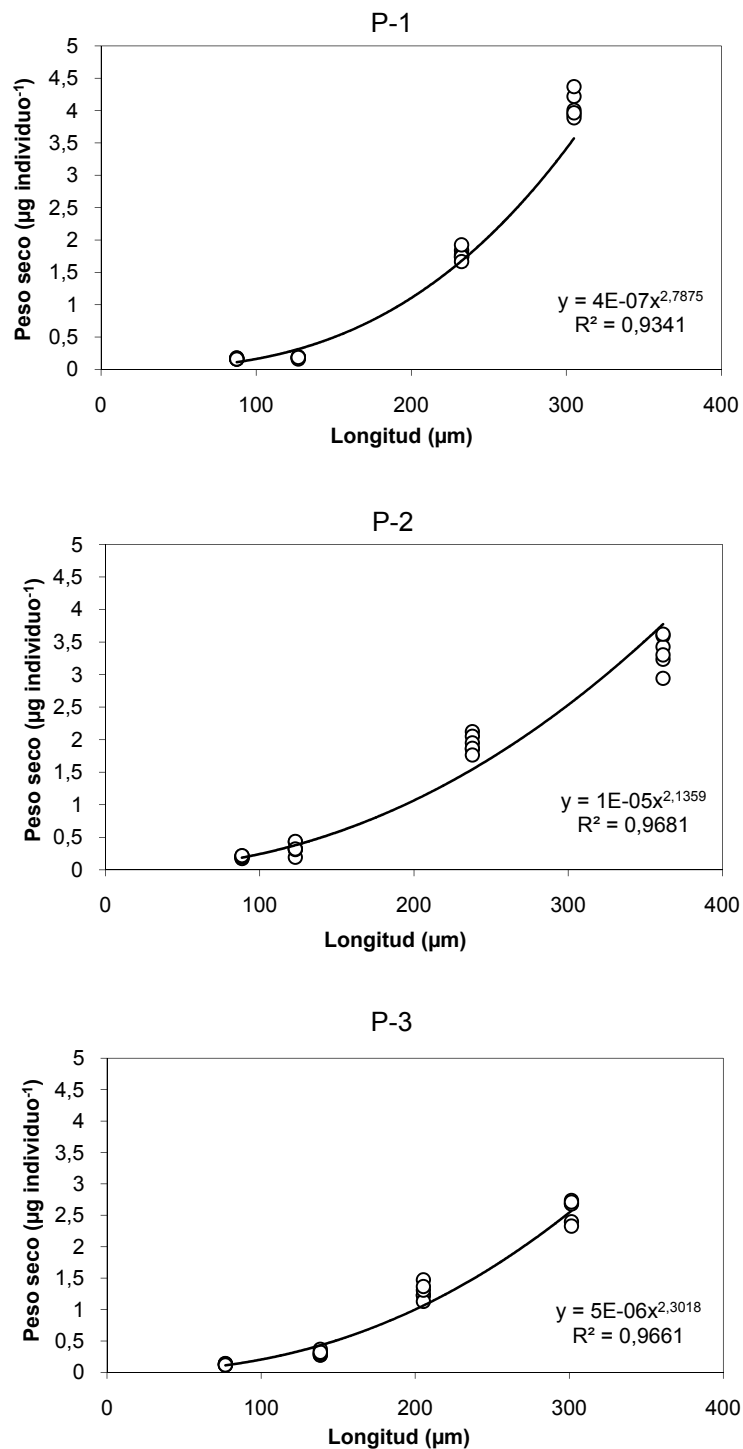


Fig. III.24. Relaciones del peso seco total ($\mu\text{g individuo}^{-1}$) con la longitud (μm) a lo largo del desarrollo larvario de *E. siliqua*. Se presentan las ecuaciones de regresión.

III.3.3.3.- Longueirón vello (*Solen marginatus*)

En la tabla III.9 se exponen los datos de dos cultivos de *S. marginatus* a lo largo del desarrollo larvario. La supervivencia desde fertilización hasta larva D recién transformada fue similar en los dos cultivos (entre el 73 y el 81%), siendo la supervivencia en la fijación más baja del 44%. La supervivencia desde larva D en P-1 superó en 22% a la calculada desde ovocitos, mientras en P-2 fue prácticamente similar. El número de ovocitos por puesta varió entre 1,7 y 3,3 millones.

Tabla III.9. Número de ovocitos liberados por puesta y valores de supervivencia (%) durante el desarrollo larvario de *Solen marginatus* en cultivos en criadero, referido al número inicial de ovocitos y de larvas D recién transformadas.

| | Nº Ovocitos | Día 0 (ovocito) | Día 1 (larva D) | Día 5-6 (pediveliger) | Día 8-9 (postlarva) |
|-------------------|-------------|--------------------|--------------------|--------------------------|------------------------|
| P-1 May.- 2004 | 3.276.000 | 100 | 73,60 | 58,83 | 43,97 |
| | - | - | 100 | 82,26 | 65,83 |
| P-2 Jun.- 2006 | 1.697.000 | 100 | 81,10 | 63,55 | 62,36 |
| | - | - | 100 | 70,90 | 68,92 |

La figura III.25 representa los datos medios con su error estándar, y sus correspondientes rectas de regresión, del crecimiento en longitud a lo largo del desarrollo larvario. Existe un ajuste lineal del crecimiento con un coeficiente de ajuste alto ($R^2 > 0,95$). El crecimiento diario en longitud fue de 15,4 y 16,7 $\mu\text{m día}^{-1}$.

La tabla III.10 muestra los valores medios para longitud y el peso seco total en distintos momentos, desde la fertilización hasta fijación, a lo largo del desarrollo larvario en los cultivos seguidos. Los pesos de los ovocitos variaron entre los 0,45 y 0,68 $\mu\text{g ind.}^{-1}$, así las larvas D veliger recién formadas pesaron 0,52 $\mu\text{g ind.}^{-1}$. En P-1 descendió el peso seco de las larvas D con respecto al peso seco de los ovocitos, mientras en P-2 se produjo un aumento. Tras la metamorfosis, las postlarvas pesaron 2,15 y 2,18 $\mu\text{g ind.}^{-1}$.

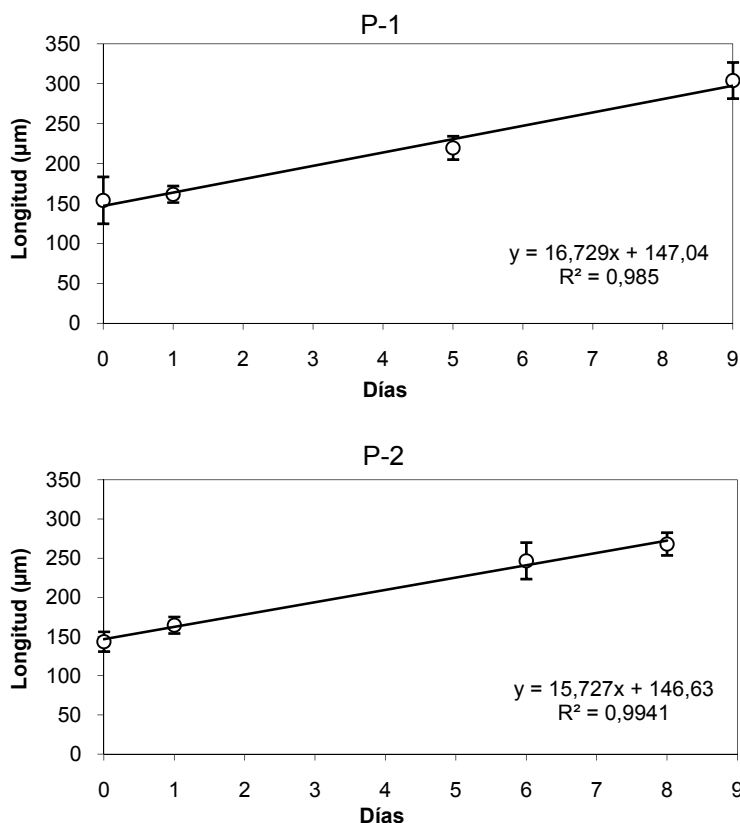


Fig. III.25. Crecimiento en longitud durante el desarrollo larvario de *S. marginatus*.

Tabla III.10. Longitudes del ovocito (día 0) y de las larvas (L , µm; $n=50$) y pesos secos ($P.S.$, µg ind⁻¹; $n=6$) mostrados en valores medios y desviación estándar ($D.E.$) en diferentes momentos del desarrollo larvario de dos puestas de *S. marginatus*. Dpf: días post-fertilización.

| Dpf | May.- 2004 P-1 | | Jun.- 2006 P-2 | |
|-----|-------------------|-----------------|-------------------|-----------------|
| | $L \pm D.E.$ | $P.S. \pm D.E.$ | $L \pm D.E.$ | $P.S. \pm D.E.$ |
| 0 | 153,94±29,37 | 0,678±0,093 | 143,40±12,61 | 0,453±0,022 |
| 1 | 161,54±10,38 | 0,525±0,046 | 170,16±45,39 | 0,525±0,030 |
| 5-6 | 219,63±14,64 | 1,180±0,069 | 246,55±23,30 | 1,442±0,047 |
| 8-9 | 303,99±22,65 | 2,155±0,189 | 268,01±14,53 | 2,180±0,067 |

La evolución del peso seco en el desarrollo larvario de *S. marginatus* se ajustó a una regresión lineal (Fig. III.26).

La relación entre crecimiento en longitud y peso seco en los dos cultivos se ajusta a ecuaciones potenciales con un coeficiente de ajuste alto ($R^2 > 0,90$) (Fig. III.27).

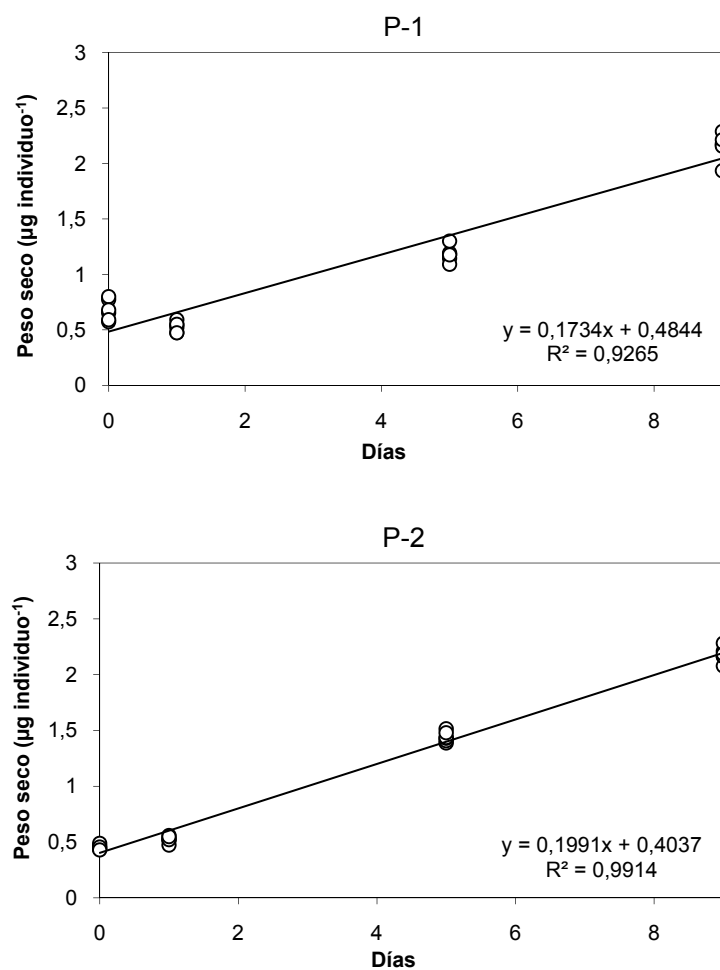


Fig. III.26. Evolución del peso seco total ($\mu\text{g individuo}^{-1}$) a lo largo del desarrollo larvario de *S. marginatus*. Se presentan las ecuaciones de regresión.

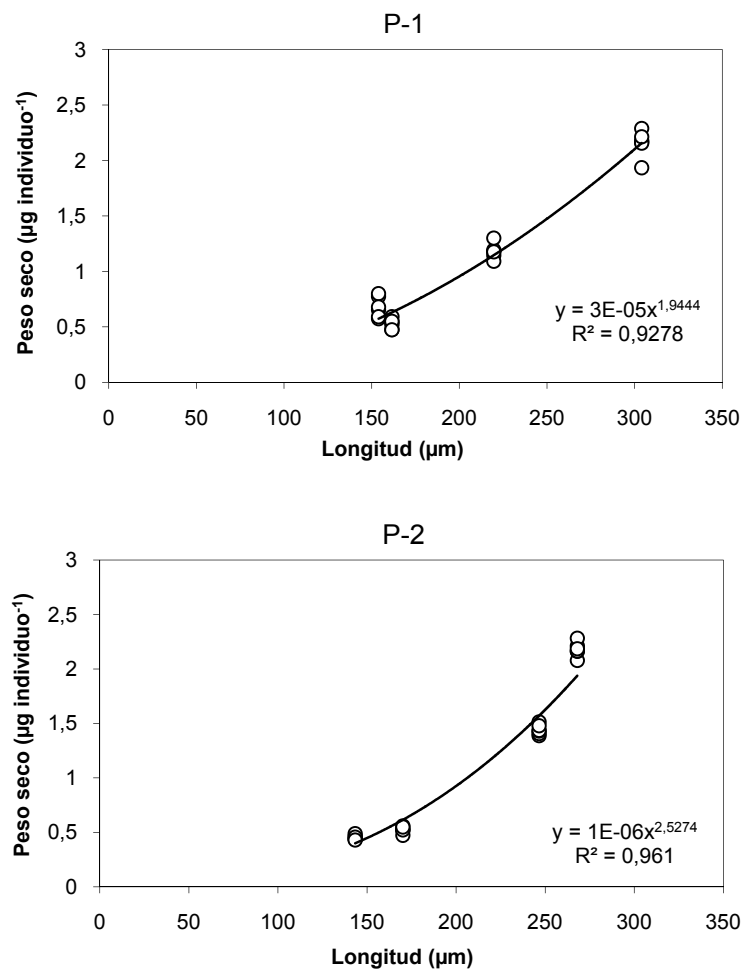


Fig. III.27. Relaciones del peso seco total ($\mu\text{g individuo}^{-1}$) con la longitud (μm) a lo largo del desarrollo larvario de *S. marginatus*. Se presentan las ecuaciones de regresión.

Los ovocitos grandes, pero de bajo peso seco, serán los cultivos que alcancen mejores supervivencias en la fase de larva D y en la fijación (Tabla III.11). Las larvas D de mayor tamaño, independientemente del peso, serán las que superen el desarrollo larvario con supervivencias más elevadas.

Tabla III.11. Coeficiente de Correlación de Spearman entre la supervivencia, el tamaño, peso seco de ovocitos y larvas D recién transformadas en *S. marginatus*. Sup-LD: supervivencia en la larva D; Sup-Fij: supervivencia en la fijación; L-Hv: diámetro del ovocito; PS-Hv: peso seco del ovocito; L-LD: longitud de la larva D; PS-LD: peso seco de la larva D. **Negrita:** correlación significativa; *: al 95% de confianza; **: al 99% de confianza.

| | Sup-Fij | L-Hv | PS-Hv | L-LD | PS-LD |
|----------------|----------------|----------------|-----------------|-----------------|--------|
| Sup-LD | 1,000** | 1,000** | -0,894** | 1,000** | 0,000 |
| Sup-Fij | | 1,000** | -0,894** | 1,000** | 0,000 |
| L-Hv | | | 0,894** | -1,000** | 0,000 |
| PS-Hv | | | | -0,894** | -0,400 |
| L-LD | | | | | 0,000 |

Tabla III.13. Niveles de significación exacta (ANOVA) en la comparación de las longitudes en los distintos estadios larvarios entre especies. *E. a*: *E. arcuatus*; *E. s*: *E. siliqua*; *S. m*: *S. marginatus*; *Hv.*: ovocito; *LD*: larva D recién transformada; *Pedi.*: pediveliger; *Postl.*: postlarva recién fijada. **Negrita**: correlación significativa; *: al 95% de confianza; **: al 99% de confianza; n.s.: no significativo.

| | | <i>E. a</i> | | | | <i>E. s</i> | | | |
|-------------|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|------------|----------------|
| | | Hv. | LD | Pedi. | Postl. | Hv. | LD | Pedi. | Postl. |
| <i>E. s</i> | Hv. | 0,006** | | | | | | | |
| | LD | | 0,003** | | | | | | |
| | Pedi. | | | 0,000** | | | | | |
| | Postl. | | | | 0,000** | | | | |
| <i>S. m</i> | Hv. | 0,000** | | | | 0,000** | | | |
| | LD | | 0,000** | | | | 0,000** | | |
| | Pedi. | | | 0,000** | | | | 0,107 n.s. | |
| | Postl. | | | | 0,000** | | | | 0,007** |

Tabla III.14. Niveles de significación exacta (U de Mann-Whitney) en la comparación de los pesos secos en los distintos estadios larvarios entre especies. *E. a*: *E. arcuatus*; *E. s*: *E. siliqua*; *S. m*: *S. marginatus*; *Hv.*: ovocito; *LD*: larva D recién transformada; *Pedi.*: pediveliger; *Postl.*: postlarva recién fijada. **Negrita**: correlación significativa; *: al 95% de confianza; **: al 99% de confianza.

| | | <i>E. a</i> | | | | <i>E. s</i> | | | |
|-------------|--------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
| | | Hv. | LD | Pedi. | Postl. | Hv. | LD | Pedi. | Postl. |
| <i>E. s</i> | Hv. | 0,043* | | | | | | | |
| | LD | | 0,041* | | | | | | |
| | Pedi. | | | 0,000** | | | | | |
| | Postl. | | | | 0,002** | | | | |
| <i>S. m</i> | Hv. | 0,000** | | | | 0,000** | | | |
| | LD | | 0,000** | | | | 0,000** | | |
| | Pedi. | | | 0,000** | | | | 0,003** | |
| | Postl. | | | | 0,000** | | | | 0,000** |

III.3.4.- Cultivo de postlarvas y semilla

III.3.4.1.- Navaja (*Ensis arcuatus*)

Al fijar las postlarvas correspondientes al único cultivo que se siguió de *E. arcuatus* (P-1) medían $361,8 \pm 42,1 \mu\text{m}$, correspondiéndose con un peso seco de $3,26 \pm 0,13 \mu\text{g ind.}^{-1}$. Las postlarvas de un mes de vida alcanzaron $861,2 \pm 185,0 \mu\text{m}$ de longitud y un peso seco de $64,20 \pm 14,62 \mu\text{g ind.}^{-1}$ (Fig. III.28). En este momento es cuando empiezan a alargarse para adquirir el aspecto alargado característico de los adultos.

Durante los primeros momentos la concha siguió siendo translúcida, permitiendo ver las estructuras del interior de los ejemplares (Fig. III.29.a). Se podía diferenciar el corazón, la glándula digestiva, pie, filamentos branquiales, intestino y sifones. La longitud media a los 90 días fue de $15,5 \pm 3,1$ mm y a los 120 días de $28,5 \pm 3,0$ mm, correspondientes a $0,42$ g ind.⁻¹ de peso fresco medio (Fig. III.29.b). Ya en esta fase la concha es opaca, aunque deja entrever sólo en un extremo la glándula digestiva de color marrón oscuro. En este momento la concha presenta la coloración y dibujos típicos presentes en los adultos, además de la curvatura característica de la especie.

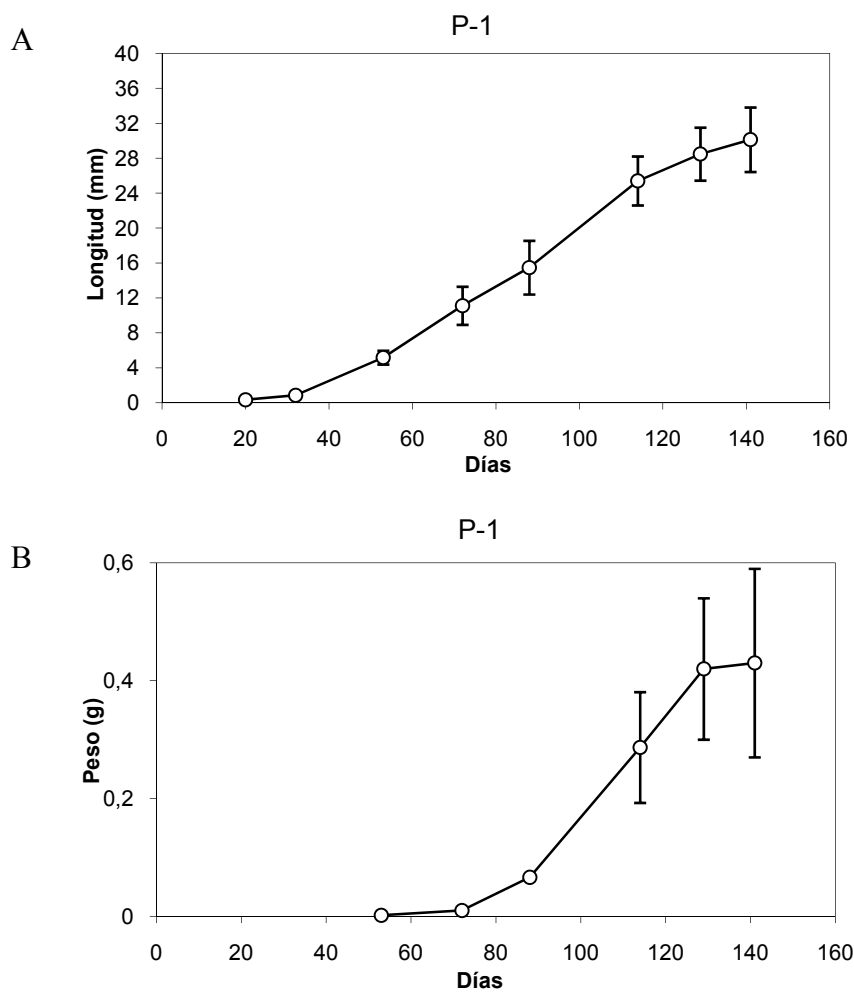


Fig. III.28. A. Crecimiento en longitud de las postlarvas y semilla de *E. arcuatus* de la puesta P-1 desde la fijación hasta los 140 días de cultivo. B. Crecimiento en peso fresco.

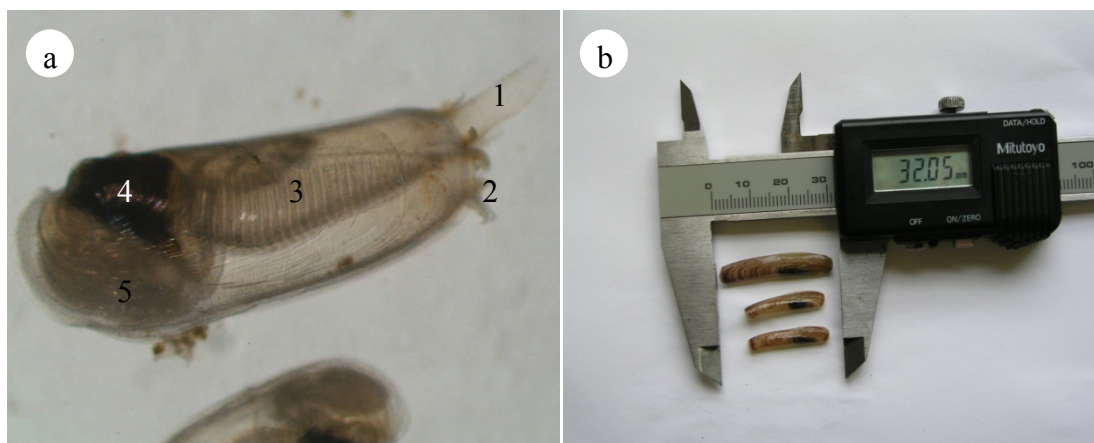


Fig. III.29.a. Postlarva de *Ensis arcuatus* de 1 mes de vida, en la que comienza a curvarse la concha. 1: sifón inhalante; 2: sifón exhalante; 3: filamentos branquiales; 4: glándula digestiva; 5: pie. b. Semilla de 3 meses.

La supervivencia de postlarvas de *Ensis arcuatus* a los 30 dpf fue del 12,3% con respecto a la fijación, produciéndose la mayor mortalidad en los primeros estadios tras la metamorfosis y hasta alcanzar la talla de 1 mm. La supervivencia a los 90 días de cultivo fue de 4,81% con respecto a la fijación.

III.3.4.2.- Longueirón (*Ensis siliqua*)

Las postlarvas recién fijadas de *E. siliqua* presentaban una talla de $304,9 \pm 28,9$ μm , con un peso seco de $4,06 \pm 0,19$ $\mu\text{g individuo}^{-1}$. Al mes de vida alcanzaron los $652,3 \pm 79,6$ μm y un peso seco por individuo de $40,25 \pm 1,35$ μg (Fig. III.30 y III.32). En las postlarvas de 1 mes de vida se pueden apreciar a través de la transparencia de la concha: la glándula digestiva, intestino, corazón, pie, filamentos branquiales y sifones. A partir de los dos meses, las valvas se van volviendo más opacas, sólo pudiéndose observar al trasluz la glándula digestiva de un color marrón oscuro. En este momento se pueden ver los dibujos y la forma recta de la concha.

III.3.4.3.- Comparativa entre especies

La comparación de la supervivencia desde fertilización hasta la larva D recién transformada muestra que no existen diferencias significativas al 95% de confianza entre las tres especies (Tabla III.12). Por el contrario, la supervivencia en la fijación fue significativamente distinta (99% de confianza) en *E. arcuatus* con respecto a *E. siliqua* y *S. marginatus*. Por otra parte, en *E. siliqua* y *S. marginatus* la supervivencia en la fijación fue similar.

Tabla III.12. Niveles de significación (test U de Mann-Whitney) en la comparación de las supervivencias en larva D veliger y en el momento de la fijación. **Negrita:** correlación significativa; *: al 95% de confianza; **: al 99% de confianza; n.s.: no significativo.

| | | <i>E. arcuatus</i> | | <i>E. siliqua</i> | |
|----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|-----------------------|------------------------|
| | | Supervivencia larva D | Supervivencia fijación | Supervivencia larva D | Supervivencia fijación |
| <i>S. marginatus</i> | Supervivencia larva D | 1,000 n.s. | | 0,386 n.s. | |
| | Supervivencia fijación | | 0,009** | | 0,386 n.s. |
| <i>E. siliqua</i> | Supervivencia larva D | 0,332 n.s. | | | |
| | Supervivencia fijación | | 0,004** | | |

La tabla III.13 muestra comparaciones de las tallas en los distintos estadios entre las tres especies. Los ovocitos y larvas D de *S. marginatus* fueron significativamente mayores (99%) que los de las dos especies de *Ensis*. Entre estas dos especies hubo un comportamiento distinto con diferencias en el tamaño de los ovocitos y larva D al 99% de confianza. Por el contrario, las pediveliger de *E. arcuatus* fueron significativamente mayores (99%) que las de las otras dos especies, que entre sí no presentaron diferencias significativas en longitud. Pero las longitudes de las postlarvas de las tres especies fueron significativamente distintas entre sí.

Por su parte, la tabla III.14 muestra comparaciones de las tallas en los distintos estadios entre las tres especies. Los pesos secos de ovocitos y larvas D recién transformadas fueron distintos al 95% de confianza entre *E. arcuatus* y *E. siliqua*, pero si se enfrentan los valores de peso seco de ambas especies con *S. marginatus*, las diferencias son altamente significativas (99%). En las pediveliger y postlarvas hay diferencias significativas entre las tres especies.

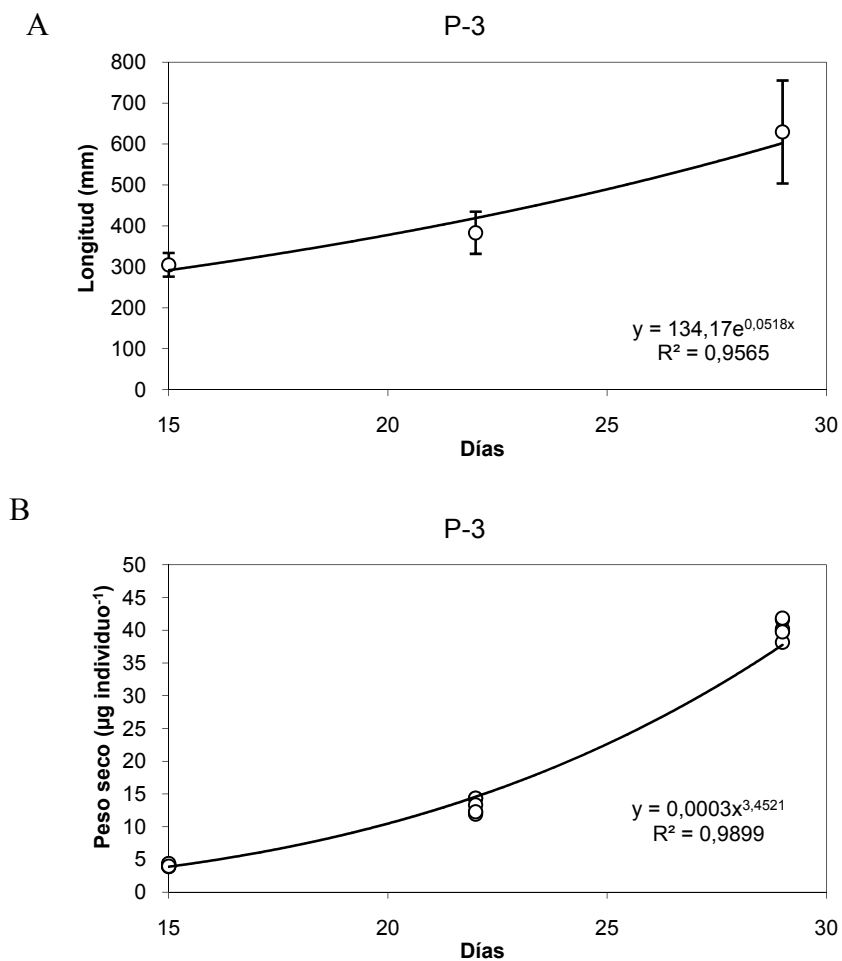


Fig. III.30. Crecimiento en longitud (A) y en peso (B) de las postlarvas de *Ensis siliqua* de la puesta P-3 desde la fijación hasta el mes de vida.

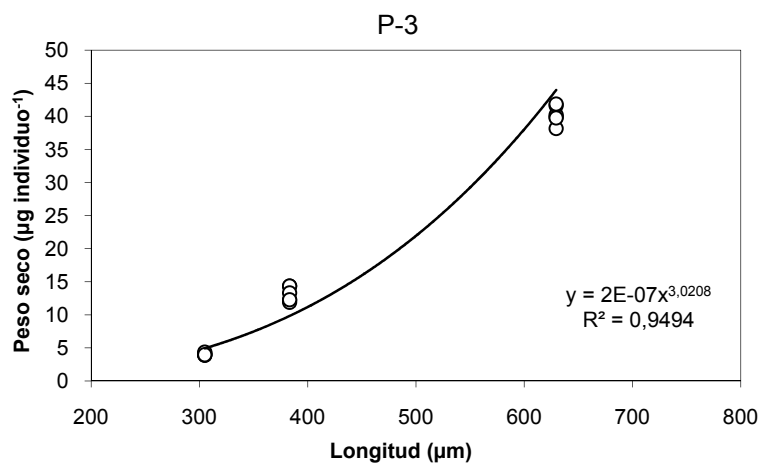


Fig. III.31. Relación longitud-peso de las postlarvas de *Ensis siliqua* de la puesta P-3 desde la fijación hasta el mes de vida.

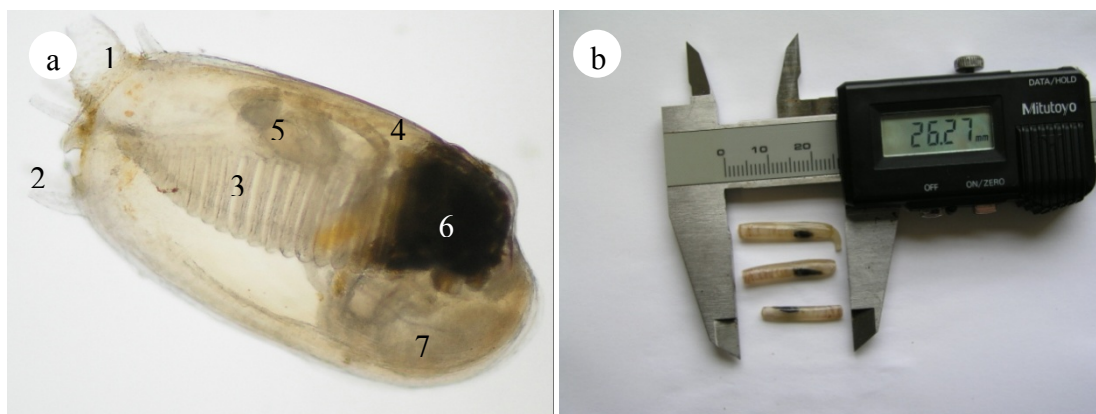


Fig. III.32.a. Postlarva de *Ensis siliqua* de 1 mes de vida. 1: sifón inhalante; 2: sifón exhalante; 3: filamentos branquiales; 4: corazón; 5: estómago; 6: glándula digestiva; 7: pie. b. Semilla de 3 meses de edad.

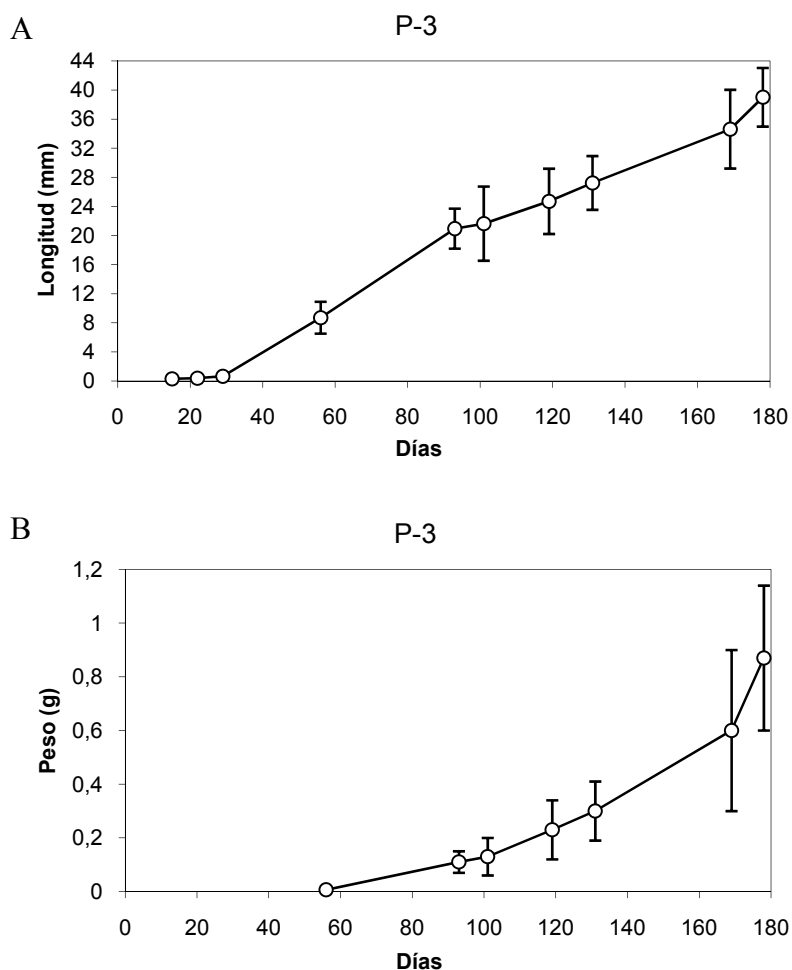


Fig. III.33. Crecimiento en longitud (A) y en peso (B) de las postlarvas de *E. siliqua* de la puesta P-3 desde la fijación hasta los seis meses de vida.

La relación longitud-peso seco sigue una curva potencial (Fig. III.31). A los 3 meses, con una longitud de $20,95 \pm 2,75$ mm, pesaron $0,11 \pm 0,04$ g. A los 6 meses de vida

siguió aumentando hasta los de $39,01 \pm 4,03$ mm, que se corresponden con un peso fresco de $0,87 \pm 0,27$ g (Fig. III.33).

La supervivencia de las postlarvas en el día 22 de cultivo fue del 15,6% y a los 30 días del 5,2%. Durante los primeros días tras la fijación, se produjo una mortalidad importante en los cultivos. Posteriormente, una vez que la talla de 1 mm se superó, la supervivencia de la semilla mejora. En la fase de semillero la supervivencia se mantuvo en 2,2% a los 120 días de cultivo.

III.3.4.4.- Longueirón vello (*Solen marginatus*)

En la fijación, a los 9 dpf de la puesta P-1, las postlarvas de *S. marginatus*, median $303,9 \pm 22,7$ μm y el peso seco era de $2,15 \pm 0,19$ $\mu\text{g ind.}^{-1}$ (Fig. III.35). Al mes de vida los individuos alcanzaron una longitud de $2135,9 \pm 520,7$ μm y un peso seco de $104,20 \pm 12,67$ $\mu\text{g ind.}^{-1}$. En este momento comienzan a adquirir el aspecto alargado característico de esta especie (Fig. III.34). En estas postlarvas se pueden ver los órganos internos a través de la concha: glándula digestiva, intestino, pie, corazón, filamentos branquiales y sifones. A los tres meses de vida la concha ya es casi totalmente opaca, sólo dejando ver de la vianda, la glándula digestiva. Las valvas poseen un color anaranjado y mate característico de la especie. Además, se observan los sifones bastante largos con respecto a la longitud de las valvas, que autotomizan como los adultos. En la figura III.35 se muestran los crecimientos en longitud y peso y sus ecuaciones ajustadas a una curva exponencial ($R^2 > 0,95$).

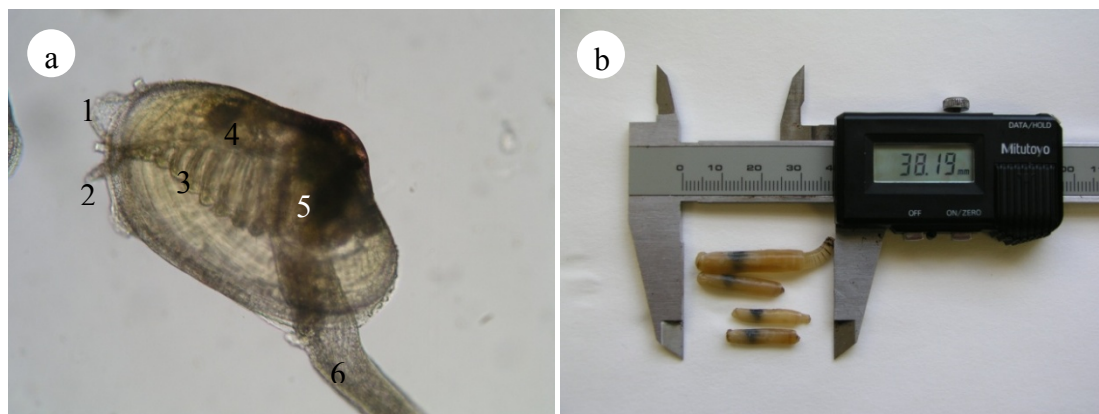


Fig. III.34. a. Postlarva de *Solen marginatus* con el pie extendido. 1: sifón inhalante; 2: sifón exhalante; 3: filamentos branquiales; 4: estómago; 5: glándula digestiva; 6: pie. b. Semilla de tres meses.

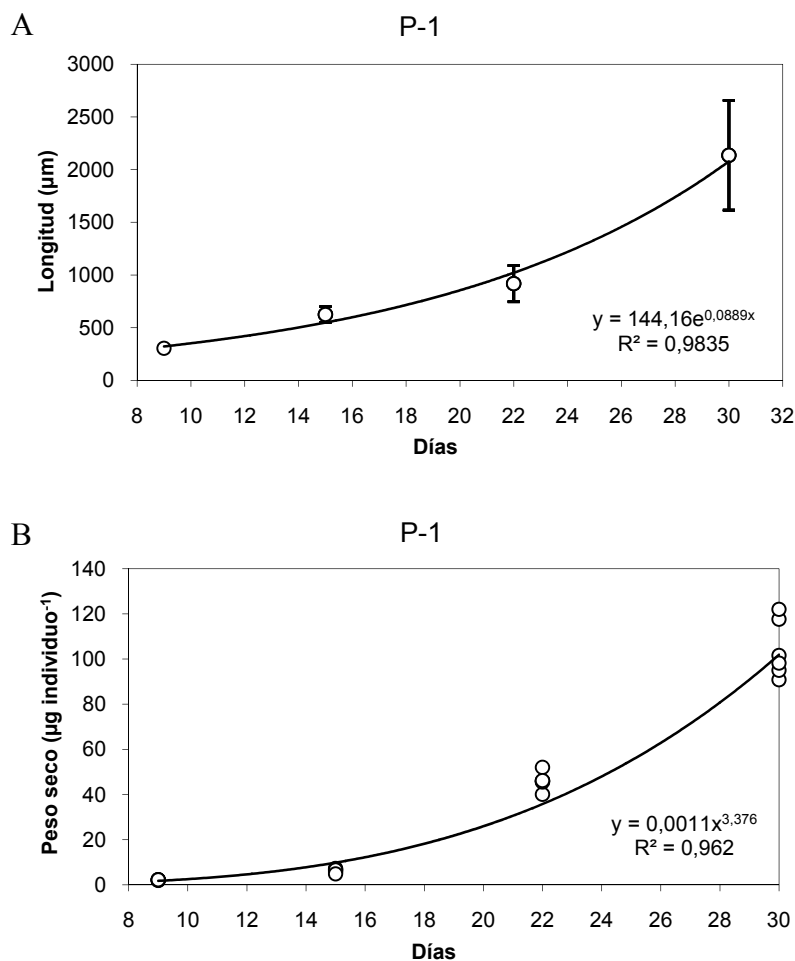


Fig. III.35. Crecimiento en longitud (A) y en peso (B) de las postlarvas de *S. marginatus* de la puesta P-1 desde la fijación hasta el mes de vida.

Para la relación longitud-peso entre la fijación y los 30 días el mejor ajuste fue una recta (Fig. III.36). El crecimiento en longitud desde el día de la fijación (día 9) al día 15, no se correspondió con un incremento en peso, sin embargo, el día 22 y 30, el incremento de talla conllevó un aumento del peso en mayor proporción.

La supervivencia de las postlarvas de *S. marginatus* se mantuvo hasta los 15 días (Fig. III.37). A partir de aquí, hasta los 22 días, se produjo una elevada mortalidad, coincidiendo con la llegada a la talla de 1 mm. A los 30 días de cultivo la supervivencia de las postlarvas fue del 16,5%.

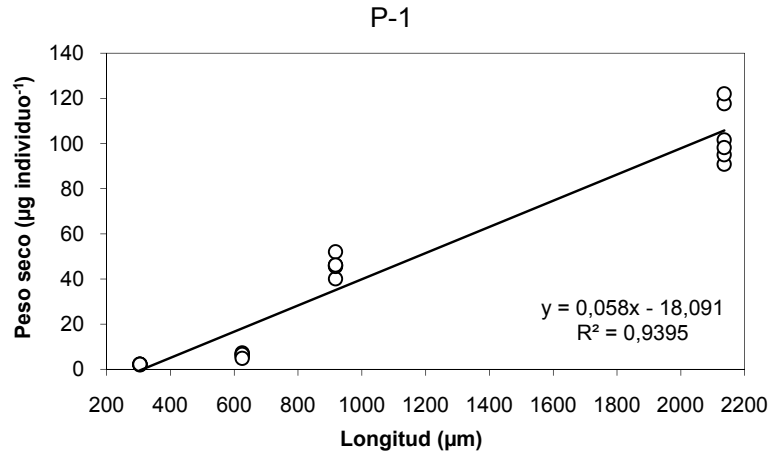


Fig. III.36. Relación longitud-peso de las postlarvas de *S. marginatus* de la puesta P-1 desde la fijación hasta el mes de vida.

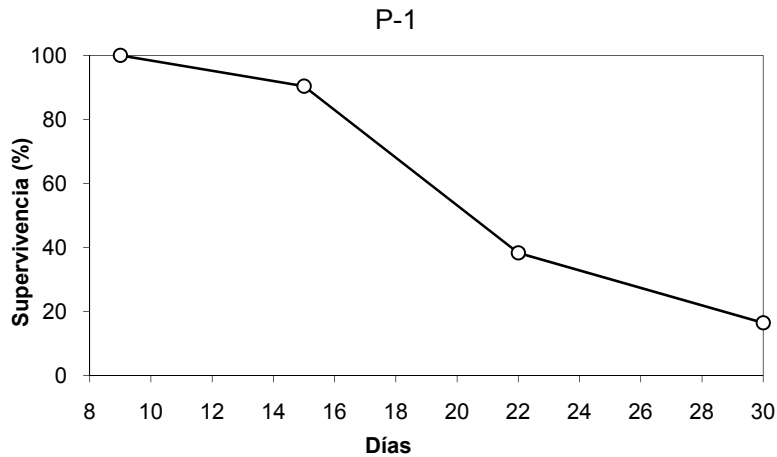


Fig. III.37. Supervivencia de postlarvas de *S. marginatus* desde la fijación hasta el mes de vida.

La semilla de *S. marginatus* a los 30 días de vida alcanzó 2 mm de longitud, creciendo hasta los 6-7 mm a los 60 días, mientras que a los 90 días la talla rondó los 15-16 mm (Fig. III.38). Por otra parte, el peso fue de 0,03-0,04 g a los 60 días, aumentando hasta 0,13 g a los 90 días. Durante la fase de semillero, a medida que aumentaba la talla, lo hacía la dispersión de los datos, pero este hecho fue mucho más acusado en el caso del peso.

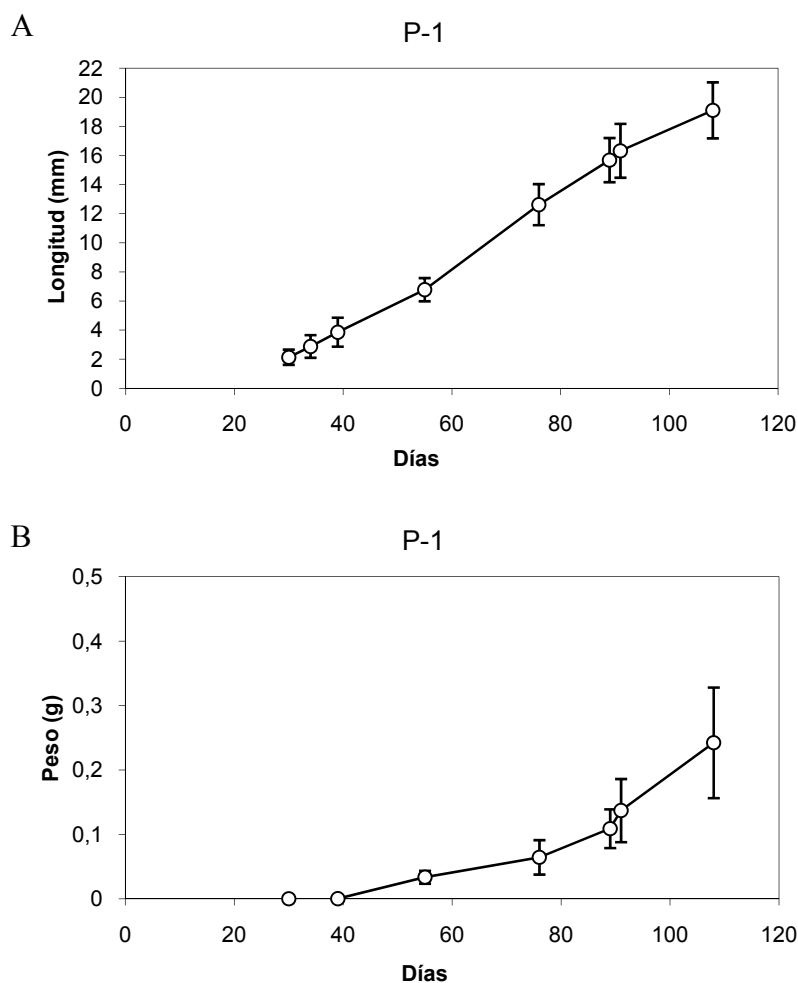


Fig. III.38. Crecimiento en longitud (A) y en peso (B) de la semilla de *S. marginatus* de la puesta P-1 desde el mes de vida hasta su posterior siembra en el medio natural.

III.3.4.5.- Comparativa entre especies

Las longitudes al mes de vida fueron significativamente distintas al 99,9% de confianza entre *S. marginatus* y las dos especies de *Ensis* estudiadas (Tabla III.15). Sin embargo, entre *E. arcuatus* y *E. siliqua* las longitudes fueron similares. Por contra, a los 3 meses de vida se observaron diferencias significativas entre las 3 especies para la longitud.

El peso fresco de la semilla cultivada en criadero a los 90 días de vida fue significativamente distinto entre *E. arcuatus* (99% de confianza) y las otras dos especies (Tabla III.16). Sin embargo, entre *E. siliqua* y *S. marginatus* el peso fresco fue similar, aunque hubo diferencias en la longitud de los ejemplares.

Tabla III.15. Comparación de la longitud al mes y a los tres meses de cultivo entre las tres especies estudiadas mediante el test ANOVA. **Negrita:** correlación significativa; *: al 95% de confianza; **: al 99% de confianza; n.s.: no significativo.

| | | <i>E. arcuatus</i> | | <i>E. siliqua</i> | |
|----------------------|---------|--------------------|----------------|-------------------|----------------|
| | | 30 días | 90 días | 30 días | 90 días |
| <i>E. siliqua</i> | 30 días | 0,194 n.s. | 0,000** | | |
| | 90 días | | | | |
| <i>S. marginatus</i> | 30 días | 0,000** | 0,000** | 0,000** | 0,000** |
| | 90 días | | | | |

Tabla III.16. Comparación del peso a los tres meses de cultivo entre las tres especies estudiadas mediante el test ANOVA. **Negrita:** correlación significativa; *: al 95% de confianza; **: al 99% de confianza; n.s.: no significativo.

| | <i>E. arcuatus</i> | <i>E. siliqua</i> |
|----------------------|--------------------|-------------------|
| <i>E. siliqua</i> | 0,000*** | |
| <i>S. marginatus</i> | 0,000*** | 1,000 n.s. |

III.3.5.- Cultivo exterior

III.3.5.1.- Crecimiento en el medio del longueirón vello (*Solen marginatus*) en relación con los parámetros medioambientales

La temperatura del agua osciló entre 8,5 y 21,8°C a lo largo de todo el período estudiado (Fig. III.39). Entre el 15 de julio y el 15 de septiembre fue cuando se alcanzaron los mayores valores de temperatura del agua de mar. Las temperaturas más bajas se produjeron entre enero y mediados de marzo. Los períodos de crecimiento coincidieron con el momento en que en el medio natural comenzó a aumentar la temperatura. Aunque si bien éste no fue el único factor que afectó al crecimiento puesto que, con valores de temperatura superiores durante el invierno, el crecimiento se detuvo.

La salinidad registrada tuvo una media a lo largo de todo el estudio de 31,9‰, consiguiendo valores inferiores durante episodios concretos en otoño e invierno (debido a intensas lluvias), alcanzando un mínimo de 15,2‰ (Fig. III.39). El resto del año se mantuvo en torno a 32-35‰. Sin embargo, los valores de la salinidad no parecen afectar al crecimiento. A excepción de descensos bruscos y puntuales, ésta se mantuvo relativamente estable durante todo el año.

A lo largo del año se muestran varios picos de concentración de clorofila “a” en la columna de agua en la Ría de Ribadeo (Fig. III.40). Las mayores abundancias de clorofila “a”, y por lo tanto de alimento en la columna de agua, se dieron en el otoño

(septiembre-octubre). Además se ven otros picos, menores a los de otoño, en la primavera (marzo-abril) y en el verano de 2006.

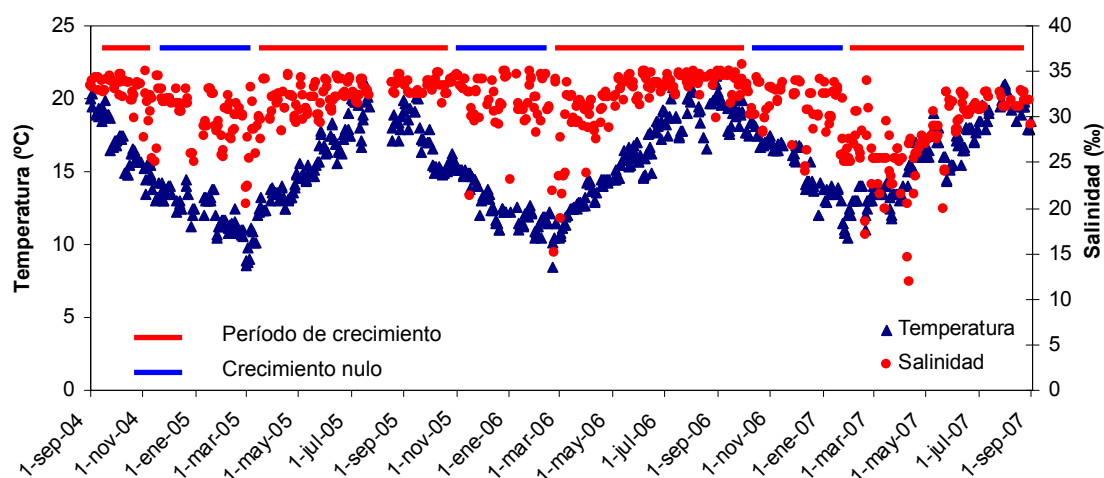


Fig. III.39. Evolución estacional de la temperatura y salinidad en la Ría de Ribadeo a lo largo del período de estudio.

Los períodos de crecimiento coincidieron en general con los momentos en que se encontraron picos de clorofila “a” (mayor cantidad de alimento presente en el medio), a excepción del pico presente a principios del otoño (octubre), que coincidió con una parada de crecimiento o crecimiento nulo.

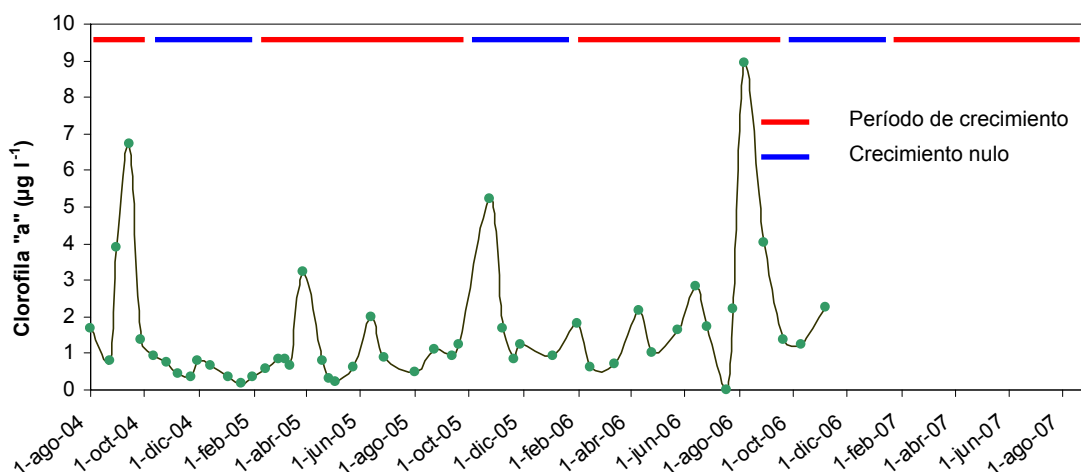


Fig. III.40. Evolución estacional de la concentración de clorofila “a” ($\mu\text{g l}^{-1}$) en la Ría de Ribadeo a lo largo del período de estudio. Datos cedidos por el Instituto Tecnológico para el Control del Medio Mariño de Galicia (INTECMAR) de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos.

III.3.5.2.- Crecimiento en el medio del longueirón vello (*Solen marginatus*)

La longitud de los ejemplares al inicio de la experiencia era de $19,10 \pm 1,93$ mm y el peso de $0,24 \pm 0,08$ g, correspondiéndose con individuos de 100 días. En noviembre y con 180 días de vida, la longitud alcanzada fue de $31,55 \pm 3,58$ mm (Fig. III.41 y III.42). Hasta este mes, y coincidiendo con el aumento de temperaturas de primavera y verano, el crecimiento fue rápido. Pero a lo largo del invierno se produjo una parada en el crecimiento, alcanzando los ejemplares al año (mayo de 2005) una longitud de $38,53 \pm 3,89$ mm, que se correspondió con un peso de $1,56 \pm 0,46$ g (Fig. III.43.a). De nuevo, a partir de abril de 2005, se produjo un crecimiento significativo hasta noviembre del mismo año en que volvió a detenerse. La supervivencia al año de vida fue superior al 80% (Fig. III.43.b). A los dos años (mayo de 2006) la talla alcanzada fue de $67,13 \pm 5,14$ mm, con una supervivencia siempre superior al 62%.

A partir de abril-mayo de 2006 empezó a aumentar tanto en talla como en peso hasta noviembre, aunque en este caso, el aumento fue menor. En mayo de 2007 (3 años de vida) los ejemplares superaron la talla comercial (80 mm), alcanzando $80,06 \pm 5,17$ mm en longitud. Al alcanzar la talla comercial la supervivencia varió entre el 50 y 83%, entre las distintas jaulas (media de $69,4 \pm 13,1\%$).

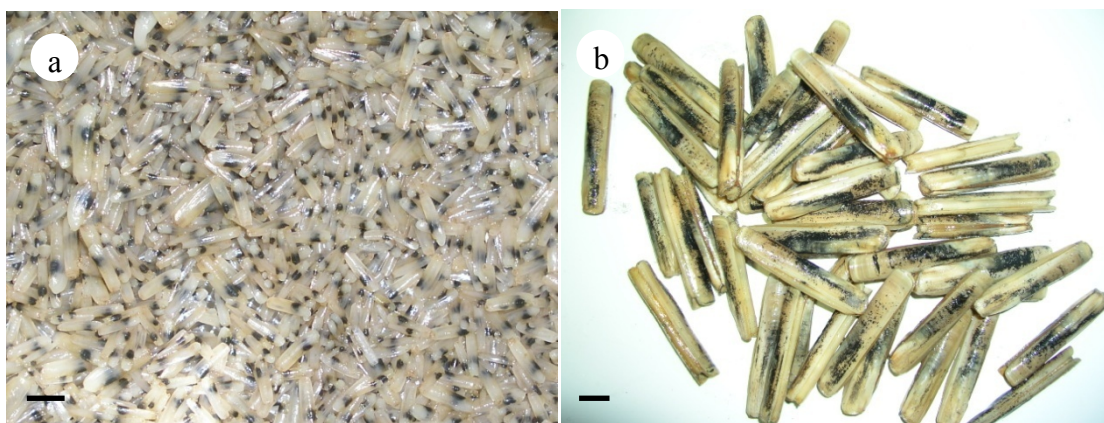


Fig. III.41.a. Semilla de *S. marginatus* de la puesta P-1 procedente del criadero al inicio de la experiencia. b. Individuos recapturados al final de la experiencia de siembra.

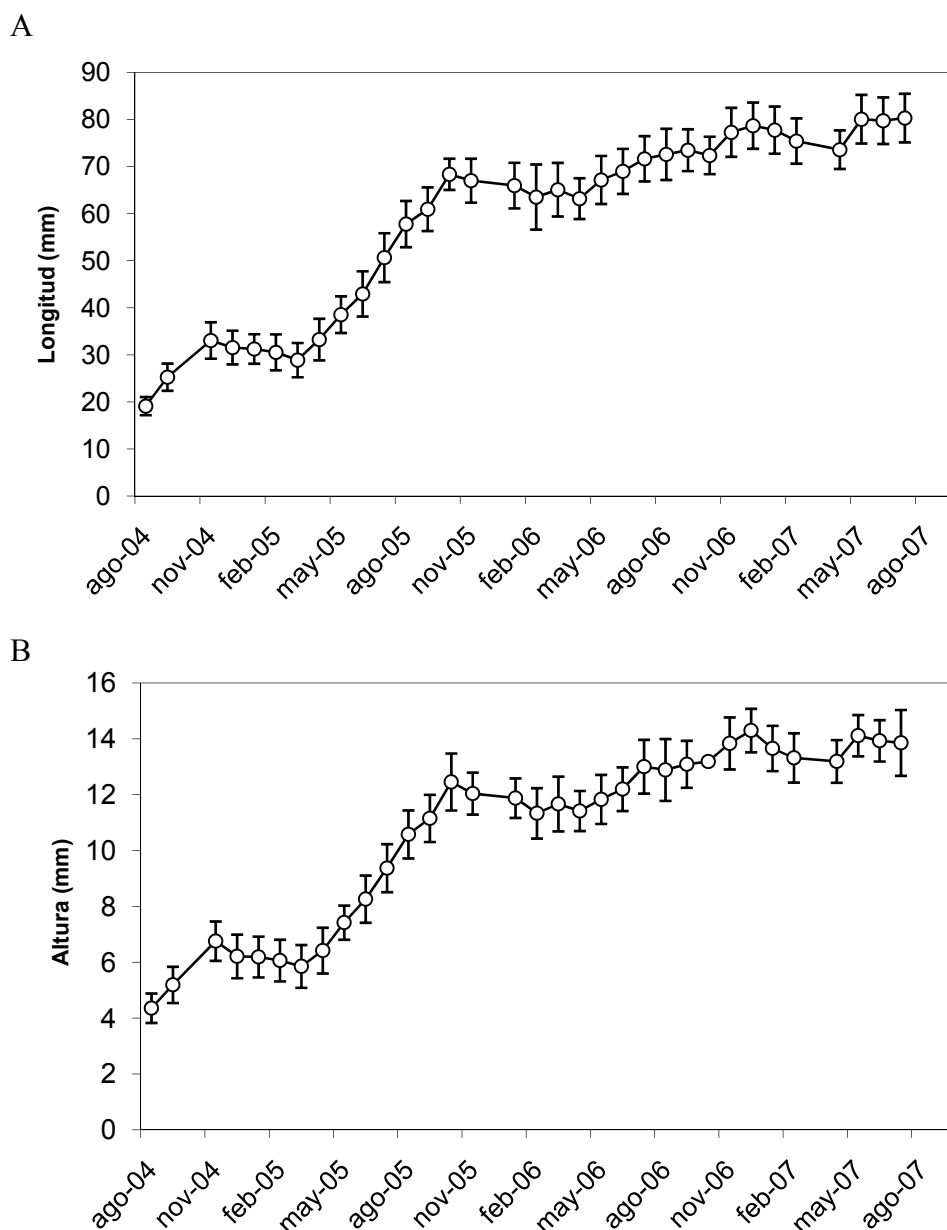


Fig. III.42. Crecimiento en longitud (A) y en altura (B) de la semilla de *S. marginatus* de la puesta P-1 procedente del criadero durante la siembra en el medio natural.

En el estudio del crecimiento en longitud, altura y peso, se puede ver como las primeras jaulas alcanzaron valores medios mayores. Esto también se puede observar en la supervivencia, por lo que se evidenciaron diferencias en la supervivencia entre jaulas.

En la figura III.44 se representan las relaciones longitud-altura y longitud-peso de los individuos cultivados. Las longitudes de los individuos analizados estaban comprendidas entre 1,13 y 91,35 mm y el peso fresco presentaba un mínimo de 0,02 y un máximo de 18,8 g. Las relaciones longitud-altura siguieron un modelo potencial con un coeficiente de 0,7868; considerado por ser menor a la unidad, como una relación

alométrica negativa. La relación longitud-peso fue isométrica, al presentar un coeficiente dentro del margen $3 \pm 0,5$.

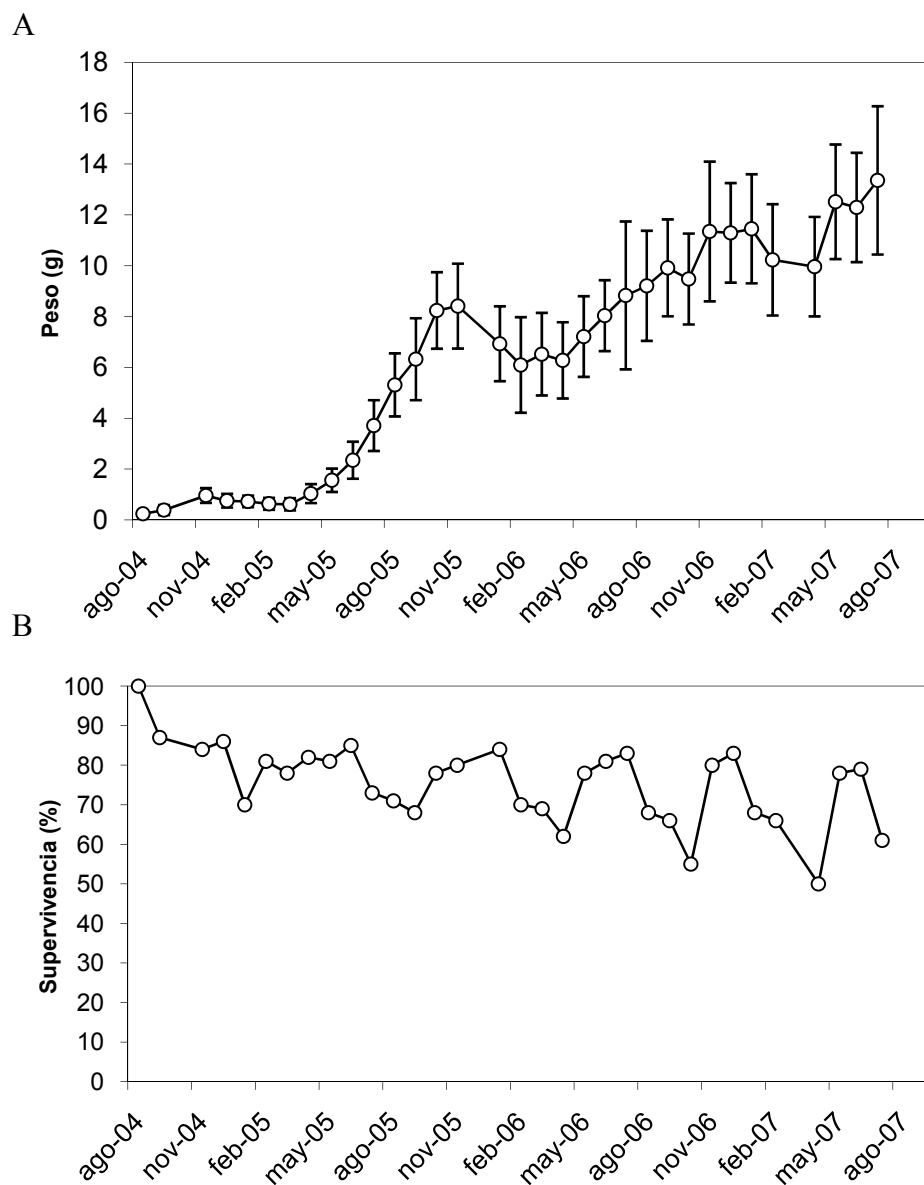


Fig. III.43. Crecimiento en peso (A) y supervivencia (B) de la semilla de *S. marginatus* de la puesta P-1 procedente del criadero durante la siembra en el medio natural.

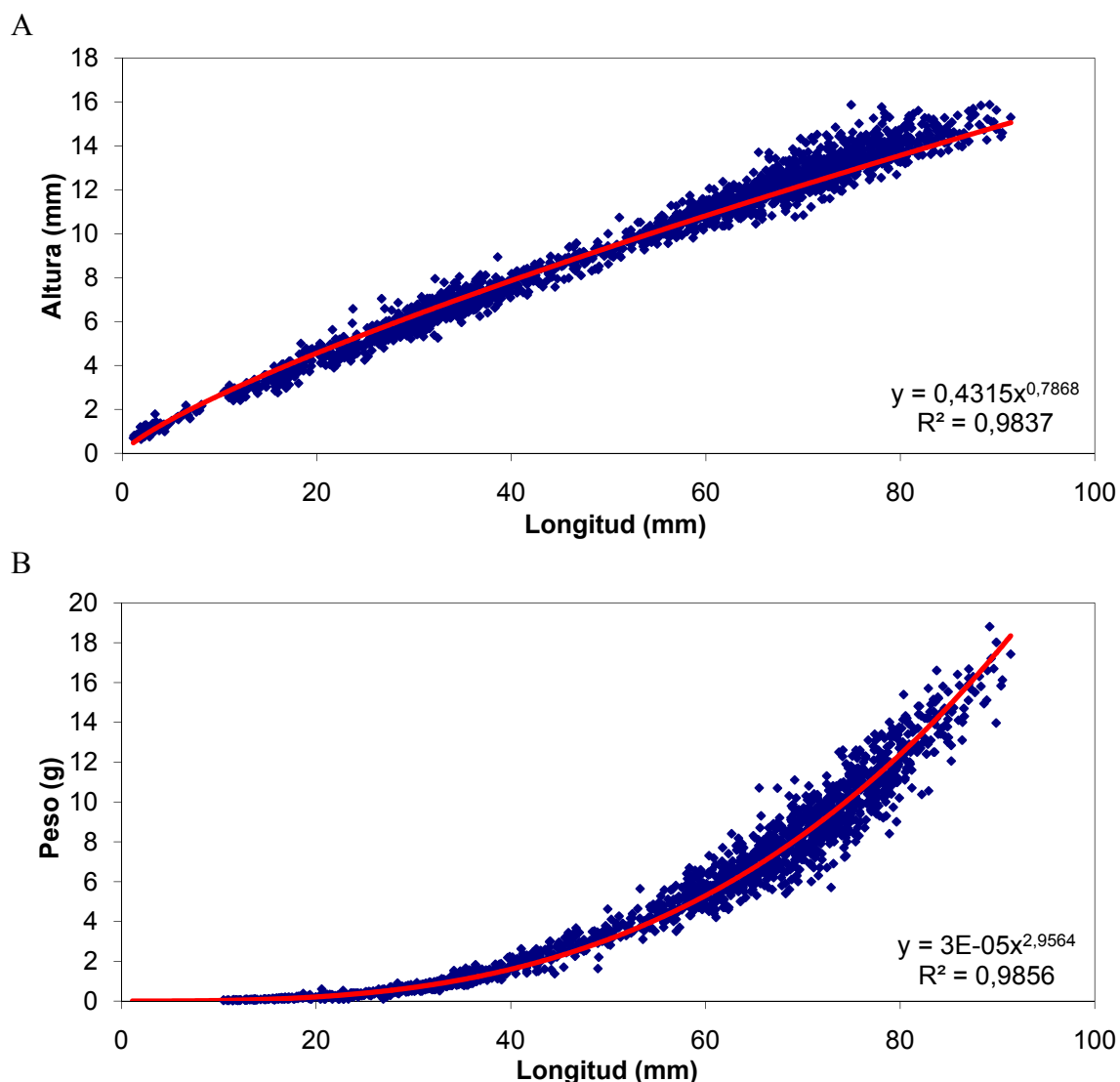


Fig. III.44. Relación longitud-altura (A) y longitud-peso (B) en la semilla de *S. marginatus* de la puesta P-1 procedente del criadero durante su cultivo en semillero y en el medio natural.

III.3.5.3.- Desoves procedentes del longueirón vello (*Solen marginatus*) cultivado en jaulas

A partir de los individuos de *S. marginatus* procedentes del cultivo en jaulas, correspondientes a la puesta obtenida en criadero, el 12-05-2004, se obtuvieron 7 puestas, realizando el seguimiento de 4 de ellas (Tabla III.17). El tamaño máximo de puesta correspondió a la puesta P-3, con 2,5 millones de ovocitos liberados. Esta puesta procedía de un tanque con 42 reproductores en el que, al ser una puesta espontánea, no se puede conocer el número de individuos que desovaron. La supervivencia más elevada en el momento de la fijación correspondió a P-1, con un 83% de supervivencia, siendo la media de los cultivos estudiados del 48%.

El mismo cultivo P-1 fue el que presenta una supervivencia más elevada a los 30 días de cultivo con respecto a los individuos fijados, con un 46%. La media de supervivencia en esta fase fue del 35%.

Posteriormente, la semilla se mantuvo en el semillero hasta alcanzar una talla adecuada para su traslado al medio natural, en donde se realizaron repoblaciones.

Tabla III.17. Número de ovocitos emitidos y supervivencias de cultivo de los desoves procedentes de los individuos mantenidos en jaulas hasta talla comercial. Sup. Fij.: supervivencia en la fijación; Sup. 30 días: supervivencia a los 30 días de cultivo con respecto a los individuos fijados.

| Puesta | Nº Ovocitos | Nº adultos | Sup. Fij. (%) | Sup. 30 días (%) |
|--------------|-------------|------------|---------------|------------------|
| P-1 26/05/07 | 2.168.000 | 42 | 82,8 | 45,6 |
| P-2 01/06/07 | 1.894.000 | 42 | 33,3 | 33,9 |
| P-3 13/06/07 | 2.500.000 | 42 | 41,1 | 35,0 |
| P-4 15/06/07 | 1.000.000 | 90 | - | - |
| P-5 27/06/07 | 1.500.000 | 90 | 36,6 | 23,5 |
| P-6 10/07/07 | 750.000 | 90 | - | - |
| P-7 18/07/07 | 500.000 | 90 | - | - |

III.4.- DISCUSIÓN

Acondicionamiento

En el acondicionamiento un factor importante es el estadio de desarrollo gametogénico inicial (Utting & Millican, 1997), puesto que muchas especies presentan un momento del año en que acondicionar no es posible modificando la alimentación y la temperatura, como en otoño en el ostreido *Crassostrea gigas* (Chávez-Villalba *et al.*, 2002a). El acondicionamiento del ostreido *Crassostrea virginica* sólo es posible una vez se han reabsorbido los ovocitos residuales (Dupuy *et al.*, 1977). Sastry (1979), estudiando varios pectínidos, halló que la maduración de los gametos únicamente se puede acelerar cuando los animales han completado una serie de “actividades complejas post-desove”. Así, Chávez-Villalba *et al.* (2002b), encontraron que *C. gigas* es receptiva a la temperatura y/o fotoperíodo durante el período de reposo sexual, para comenzar el desarrollo gametogénico.

Por el contrario, Bayne *et al.* (1975) no encontraron resultados satisfactorios desde reposo en *Mytilus edulis*, sino que los individuos tienen que haber desarrollado las células sexuales al menos hasta un estadio temprano de la gametogénesis. En la almeja fina *Ruditapes decussatus* partiendo desde reposo se obtienen individuos maduros tras 14 semanas de acondicionamiento (Ojea *et al.*, 2007), por lo que no resultaría interesante realizar el acondicionamiento en criadero debido al tiempo que se tarda en alcanzar la madurez. En nuestro caso, partiendo de reposo gonadal en *E. arcuatus*, se consigue una pequeña proporción de individuos en madurez al final de la experiencia, similar a como estaría la población del medio natural. De modo similar en *S. marginatus* y *E. siliqua* se alcanzan estadios de madurez y puesta a finales de abril, comparado con madurez en mayo y junio en el medio natural. Por lo tanto, no se conseguiría adelantar la maduración en el criadero.

En *E. arcuatus* y *E. siliqua* desde el estadio de inicio de la gametogénesis, se obtendrían resultados similares a los logrados a partir del reposo gonadal, con estadios de madurez próximos a los del medio natural.

Sin embargo, si comenzamos el acondicionamiento desde gametogénesis avanzada en *E. siliqua* y *S. marginatus*, se obtienen estadios de madurez en marzo,

adelantando entre 1 y 2 meses la maduración con respecto al medio natural. No obstante, en *E. arcuatus* se consiguen individuos maduros en el mismo momento que en el medio natural, no consiguiendo adelantar la puesta.

La temperatura del agua condiciona la actividad metabólica de los bivalvos, influye en el inicio del desarrollo gonadal y en el desarrollo en sí (Hamida *et al.*, 2004). En la mayoría de los bivalvos el incremento de la temperatura durante el acondicionamiento favorece el proceso de vitelogénesis (Robinson, 1992). Delgado & Pérez-Camacho (2007) estudiando la maduración en las almejas *Ruditapes decussatus* y *R. philippinarum*, encontraron que a 18°C las dos especies maduran antes que a 14°C. En el acondicionamiento de otoño de la almeja fina *R. decussatus* (partiendo de reposo gonadal) e incrementando la temperatura hasta 20°C, tanto en gradiente como a temperatura constante, se alcanza la madurez en 14 semanas (Ojea *et al.*, 2007). En las pruebas de invierno este tiempo se reduce a 6-7 semanas y en primavera se producen puestas espontáneas a partir del primer mes.

En *E. arcuatus* no se obtuvieron buenos resultados en las pruebas de acondicionamiento a 18±1°C. En esta especie se obtienen mejores resultados realizando el acondicionamiento en criadero a la temperatura presente en el medio natural en esa época del año (15°C al inicio y paulatinamente va descendiendo según avanza la experiencia) (da Costa *et al.*, 2005). En el medio natural esta especie sigue el mismo patrón, paraliza la gametogénesis en verano cuando los valores de temperatura del agua superficial son máximos, y el desarrollo gonadal tiene lugar en la época más fría (Darriba *et al.*, 2004). El pectínido *Argopecten purpuratus* tampoco responde a los incrementos de temperatura para acelerar la maduración, obteniéndose mejores resultados a 16°C que a 20°C (Martínez *et al.*, 2000).

Inducción a la puesta

Los cambios de temperatura inducen la puesta en venéridos de un modo satisfactorio (Stephenson & Chanley, 1979), pero no es eficiente en la mayoría de las especies, incluso dentro de la misma familia (D'Asaro, 1967). Loosanoff & Davis (1963) indican que en *Ensis directus*, cuando se aumenta la temperatura desde 13 a 25°C, se produce el desove. Lépez *et al.* (2005) han conseguido en *Ensis macha* inducir

a la puesta con choque térmico satisfactoriamente. En nuestro estudio *E. siliqua* desovó con choque térmico. De los métodos probados en el longueirón vello (*S. marginatus*), sólo los cambios de temperatura estimulan el desove pasadas unas horas, recogiendo el desove al día siguiente. Aún así, se consiguen larvas suficientes para llevar a cabo los cultivos larvarios y obtener semilla, no siendo éste un factor limitante para el cultivo.

Con *E. arcuatus* se ha conseguido desarrollar un método efectivo para la inducción a la puesta, mediante la modificación del nivel del agua, con breves períodos de desecación. La falta de respuesta en la navaja, al elevar la temperatura del agua, es coincidente con su comportamiento en el medio natural, puesto que la emisión de gametos se produce entre enero y abril, cuando la temperatura del agua es baja. En los adultos se produce el vaciado de las gónadas cuando se empiezan a calentar las aguas.

En *Siliqua patula* (Familia Cultellidae), Breese & Robinson (1981) encontraron que los métodos de inducción usados comúnmente en otras especies de moluscos no habían dado resultados satisfactorios. Estos investigadores consiguieron larvas a partir del raspado de gónadas y con altas concentraciones de la microalga *Pseudoisochrysis paradoxa*. Al realizar raspado de gónadas en *Siliqua patula* se consiguieron rendimientos que variaron entre el 6 y el 35% hasta larva D veliger de 48 horas. Estos autores justifican el poco éxito en la fertilización debido a la imposibilidad de separar los ovocitos inmaduros de los maduros. En *E. directus*, con el raspado de gónadas de hembras acondicionadas se pueden conseguir larvas, aunque el éxito varía en función del estadio de madurez (Loosanoff & Davis, 1963). Al principio del período de puesta, cuando los ovocitos mayores miden 66 µm, la fertilización no es posible, pero cuando los individuos están más maduros, un alto porcentaje de los huevos se dividen, dando lugar a gran cantidad de larvas deformes. En nuestro trabajo el raspado de gónadas de las tres especies no ha sido efectivo para la producción de larvas. En ninguna de las pruebas realizadas durante la época de madurez se observó una fecundación y posterior desarrollo embrionario.

Otro método ensayado en este estudio fue el flujo de agua de mar filtrada y esterilizada con ultravioleta, que no ha sido efectivo en ninguna de las tres especies estudiadas.

Cultivo larvario

El tamaño de los ovocitos de *Ensis arcuatus* (75 μm) es similar al de otra especie de solénido como es *E. directus* (Loosanoff & Davis, 1963; Loosanoff *et al.*, 1966). *Venerupis pullastra* posee ovocitos con un diámetro de 72 a 79 μm (Nóvoa, 2007). En *E. siliqua* los ovocitos tienen un diámetro mayor, próximo a 100 μm . Sin embargo, *Solen marginatus* tiene un diámetro de 150 μm , al presentar una envuelta coriónica de aproximadamente 30 μm de espesor, midiendo el ovocito aproximadamente 100-110 μm . Según Ockelmann (1965), los ovocitos de pequeño tamaño (40-90 μm) y con un vitelo limitado son típicos del desarrollo planctotrófico, en el que las larvas necesitan alimentarse para superar la metamorfosis. Este autor considera una estrategia lecitotrófica cuando la especie presenta ovocitos de talla superior a 90 μm de diámetro, con grandes acúmulos de lípidos, y que no necesitan alimentarse del medio para superar la metamorfosis. En nuestro caso, *E. siliqua* y *S. marginatus* presentan un desarrollo larvario planctotrófico, a pesar de que sus ovocitos midan más de 90 μm . En *Scrobicularia plana*, también está presente la envuelta coriónica con un diámetro de 140-150 μm , midiendo los ovocitos 75-80 μm , y presentando un desarrollo planctotrófico (Frenkiel & Mouëza, 1979). Al menos en estas especies, tamaños de ovocitos superiores a 90 μm , no implicarían la existencia de un desarrollo larvario completamente lecitotrófico.

Además, el tamaño de los ovocitos se puede relacionar con la duración del período larvario. Así, en *E. arcuatus* el período larvario es de 20 días y los ovocitos miden 75 μm . En *E. siliqua* las larvas tardan en fijar 14 días con un ovocito un poco mayor (100 μm) y en *S. marginatus* es más rápido, durando sólo 8 días, con un ovocito de 150 μm . Sin embargo, en otras especies podría no haber una correlación tan clara. En *V. pullastra* se observan ovocitos entre 72-79 μm , y una duración del cultivo larvario de 13 a 22 días (Nóvoa, 2007). *S. plana* con ovocitos de 140-150 μm tarda 4 semanas en fijar (Frenkiel & Mouëza, 1979). Breese & Robinson (1981) encontraron que en *Siliqua patula* la metamorfosis se produce a los 20-25 días partiendo de un tamaño de ovocito de 90 μm . En nuestro laboratorio, según las experiencias realizadas, se consiguió que *Donax trunculus* y *R. decussatus* con ovocitos de 70-80 μm alcanzasen la fijación en 30 días (Martínez *et al.*, 2008).

En general, a mayor tamaño de ovocito el peso seco suele incrementarse así como el contenido en reservas almacenadas. El peso de los ovocitos en las dos especies de *Ensis* es similar, variando entre 0,14 y 0,16 $\mu\text{g ind.}^{-1}$ en *E. arcuatus* y *E. siliqua*, correspondiéndose con tamaños de 71-76 μm y 77-89 μm , respectivamente. A su vez los pesos secos de los ovocitos de *Ensis* son diferentes a los de *S. marginatus* (0,55 $\mu\text{g ind.}^{-1}$, para ovocitos de entre 143-154 μm), siendo entre 3 y 4 veces menores. Así, vemos como estas tres especies de solénidos tienen pesos secos elevados en los ovocitos. En el caso de *S. marginatus* el elevado peso seco obtenido es debido al gran tamaño de los ovocitos, en los que se acumulan muchas reservas energéticas. El peso seco de los ovocitos de estas tres especies de solénidos es elevado si se compara con los valores de otras especies como el venérido *Mercenaria mercenaria* (0,06 $\mu\text{g ind.}^{-1}$, con 56 μm de diámetro), el ostreido *Crassostrea virginica* (45 μm y 0,05 $\mu\text{g ind.}^{-1}$) (Gallager *et al.*, 1986), el mitílido *Mytilus galloprovincialis* (61 μm de diámetro y 0,05 $\mu\text{g ind.}^{-1}$) (Sedano, 1992) y la almeja babosa *Venerupis pullastra*, para la cual Nóvoa (2007) cita pesos secos que varían entre 0,03 y 0,05 $\mu\text{g ind.}^{-1}$ (correspondiéndose con ovocitos de 76 μm).

Además de las diferencias presentes entre especies, se deben tener en cuenta las diferencias entre los individuos de cada especie. En este apartado se analiza la variabilidad entre las distintas puestas, que puede ser determinada por las características de los ovocitos de buena calidad de cara al cultivo. Así, según los resultados obtenidos en los cultivos y lo que se desprende de los análisis estadísticos, se pueden extraer las siguientes afirmaciones: 1. en *E. arcuatus* los ovocitos de un tamaño pequeño pero un elevado peso seco, serían los que maximizarían la supervivencia en la larva D y tras todo el desarrollo larvario (fijación); 2. por el contrario, en *S. marginatus* los ovocitos grandes y de menor peso seco, serían los necesarios para obtener las mejores supervivencias en la fase de larva D y en la fijación; y 3. sin embargo, en *E. siliqua* ni el tamaño ni el peso seco de los ovocitos explicarían las supervivencias en el cultivo larvario. Aunque en este apartado se hace referencia al tamaño de los ovocitos y al peso seco de los mismos, éstos no son los únicos factores que afectan al rendimiento de los cultivos, sino que la composición bioquímica y de ácidos grasos, que se analizarán en capítulos posteriores, pueden aportar una visión más amplia.

Kraeuter *et al.* (1982) estudiando el venéreo *Mercenaria mercenaria* y el pectínido *Argopecten irradians* observaron que pequeñas diferencias en el tamaño de los ovocitos pueden ser importantes en la supervivencia. Estas diferencias podrían indicar cambios en las cantidades de lípidos o de otras reservas almacenadas en los ovocitos. Bricelj (1979), demostró que al inducir el desove de *M. mercenaria* provocaba la emisión de dos clases de talla de ovocitos y que estas tallas se aproximaban a una distribución bimodal, con dos modas o valores de la variable que se representan con mayor frecuencia en una distribución. Los desoves más tardíos en el año presentan una mayor proporción de ovocitos más pequeños. Por su parte, estos mismos autores observaron que la proporción total de cada categoría de talla en los ovocitos puede cambiar a lo largo del tiempo y con distintos progenitores. Estos investigadores admiten que hay otros muchos factores además del tamaño del huevo que afectan a la supervivencia entre el ovocito y el mes de cultivo tras la fijación, pero concluyen que los ovocitos de tallas mayores presentan una influencia significativa, y a lo largo del tiempo, en la supervivencia. Dey (1979) cita que las larvas de *M. mercenaria* de mayor tamaño crecen más rápido y fijan antes que las larvas de menor tamaño de su misma puesta.

La relación entre el tamaño del ovocito y la talla de la larva D recién transformada, puede dar información valiosa para el cultivo. Ockelmann (1965) examinó la relación entre el tamaño de los ovocitos y la talla de la prodisoconcha I en Mytilidae, encontrando que a mayor tamaño del huevo la prodisoconcha I era mayor (Tabla III.18). En las especies estudiadas en este trabajo se comprueba que a mayor talla de ovocito es mayor la de la larva D recién transformada. Se puede apreciar como las dos especies de *Ensis* presentan diámetros en los ovocitos similares a las especies de venéreos antes citadas, aunque una mayor longitud en las larvas D veliger. En el caso de *S. marginatus* al partir de un ovocito grande, se alcanza una longitud mayor en la larva D. En las especies de *Chlamys*, para un mismo diámetro ovocitario, se encuentran distintas tallas en la larva D.

Tabla III.18. Relación entre el diámetro de los ovocitos y la talla de la larva D recién transformada en varias especies de moluscos bivalvos.

| Especie | Talla del ovocito (µm) | Talla de la larva D (µm) | Autores |
|-----------------------------|------------------------|--------------------------|--|
| <i>Ensis arcuatus</i> | 70-75 | 117-125 | Presente estudio |
| <i>E. siliqua</i> | 90-100 | 123-138 | Presente estudio |
| <i>Solen marginatus</i> | 140-150 | 155-160 | Presente estudio |
| <i>E. directus</i> | 64-73 | 80-92 | Loosanoff & Davis (1963) Loosanoff <i>et al.</i> (1966) |
| <i>Siliqua patula</i> | 90 | 110 | Breese & Robinson (1981) |
| <i>Chlamys hastata</i> | 70 | 105 | Gruffydd (1976) |
| <i>C. islandica</i> | 70 | 120 | Hodgson & Burke (1988) |
| <i>Venerupis pullastra</i> | 70-75 | 105-110 | Martínez <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Ruditapes decussatus</i> | 70-80 | 100-105 | Martínez <i>et al.</i> (2008) |
| <i>Donax trunculus</i> | 75-80 | 110 | Martínez <i>et al.</i> (2008) |

En la mayoría de las especies se produce un aumento de peso seco entre ovocito y la larva D veliger. A pesar del descenso de reservas energéticas que se produce a lo largo de la embriogénesis, el peso seco aumenta en estas especies debido a la formación de la concha larvaria. La tendencia en la evolución de los pesos secos desde ovocito a larva D es similar en las dos especies de *Ensis*, doblándose en *E. arcuatus* y casi haciéndolo en *E. siliqua*. Sin embargo, en *S. marginatus* se observa un descenso, que podría deberse a la pérdida de la envuelta coriónica en esta fase, pasando de 0,566 µg ovocito⁻¹ a 0,525 µg larva D⁻¹. En las tres especies se incubaron los embriones a 18°C. En otras especies, como en *C. virginica* mantenida a 25°C el peso de ovocito a larva D aumenta de 0,04 a 0,062 µg ind.⁻¹ o en *M. mercenaria* cultivada a 22°C que pasa de 0,062 a 0,221 µg ind.⁻¹ (Gallager *et al.*, 1986). En *V. pullastra* los ovocitos aumentan de 0,03-0,05 a 0,07-0,13 µg ind.⁻¹ en las larvas D de dos días tras la incubación a 18°C (Nóvoa, 2007) y en *M. galloprovincialis* mantenido a 18°C aumentan de 0,05 hasta 0,11 µg ind.⁻¹ (Sedano, 1992).

Cabe estudiar las supervivencias en varias fases del cultivo, como la supervivencia hasta alcanzar el estadio de larva D, puesto que hasta ese momento las larvas viven a expensas de las reservas almacenadas en el ovocito. Las supervivencias encontradas en estas tres especies de solénidos no muestran diferencias significativas en la fase de larva D, variando entre el 70 y 80% en la mayoría de los casos. En *Siliqua patula* la supervivencia hasta larva D varió entre el 38 y 60% para ovocitos liberados tras la inducción a la puesta (Breese & Robinson, 1981). En las experiencias realizadas con *Mercenaria mercenaria* la supervivencia hasta el día 1 varió del 87 al 20% y en *Crassostrea virginica* del 90 al 20% (Gallager & Mann, 1986).

La influencia de la longitud y el peso seco de las larvas D en la supervivencia en esta fase presenta resultados variables entre las tres especies. En *E. siliqua*, a mayor talla y peso seco de las larvas D, se obtendrán mejores supervivencias de las mismas. En *S. marginatus* sólo la longitud de las larvas D veliger muestra correlación positiva con la supervivencia en la larva D, por lo que a medida que aumenta la longitud, aumenta la supervivencia. Sin embargo, en *E. arcuatus* la longitud de las larvas D no influye en la supervivencia en esta fase. Pero, el peso seco lo hace de forma negativa, ya que a medida que aumenta el peso seco de las larvas D, desciende la supervivencia tras superar el desarrollo embrionario.

Metamorfosis y fijación

En el estudio de la fijación y metamorfosis en bivalvos es fundamental determinar la duración del desarrollo larvario y la talla a la que se produce la fijación de las postlarvas. La metamorfosis en *E. arcuatus* se alcanza a los 20 días con una talla media de $358,6 \pm 69,4 \mu\text{m}$, siendo un poco inferior en *E. siliqua* ($303,1 \pm 34,5 \mu\text{m}$), pero se produce la metamorfosis en 14 días, mientras que para la misma especie Martínez (2002) cita una talla de $375 \mu\text{m}$ y 19 dpf para la fijación. *S. marginatus* llega a postlarva a los 9 dpf con una talla menor $285,2 \pm 26,2 \mu\text{m}$, mientras Martínez (2002), consiguió postlarvas recién fijadas de $360\text{-}370 \mu\text{m}$. Aunque las condiciones de cultivo fueron similares, esta diferencia en la talla de fijación podría deberse a haber utilizado métodos distintos para medir las larvas. En el caso de *Siliqua patula* cultivada a $16,5 \pm 1,5^\circ\text{C}$, está lista para la metamorfosis a los 20 días con una talla de $300 \mu\text{m}$ (Breese & Robinson, 1981). En *E. macha* se alcanza el estadio de larva premetamórfica a los 15-20 días de cultivo (López *et al.*, 2005). Kenchington *et al.* (1998) obtuvieron larvas pediveliger de *E. directus* a los 15-16 días, con una talla media de $245 \times 206 \mu\text{m}$.

En la tabla III.19 se puede observar cómo, en general, a medida que aumenta la talla de fijación se incrementa el peso seco de las postlarvas recién metamorfoseadas. Esto es lo que sucede en las tres especies estudiadas, en *E. arcuatus* las postlarvas recién fijadas son las que presentan mayor peso seco debido al mayor tamaño que alcanzan, seguido por *E. siliqua* y *S. marginatus*, presentando diferencias estadísticamente significativas entre las tres especies.

Tabla III.19. Relación entre la talla de fijación y el peso seco de las postlarvas recién fijadas en varias especies de moluscos bivalvos.

| Especie | Talla fijación (µm) | Peso seco fijación (µg ind. ⁻¹) | Autores |
|----------------------------------|---------------------|---|-------------------------------|
| <i>Ensis arcuatus</i> | 325-382 | 3,26-6,78 | Presente estudio |
| <i>E. siliqua</i> | 301-362 | 2,59-4,06 | Presente estudio |
| <i>Solen marginatus</i> | 268-304 | 2,16-2,18 | Presente estudio |
| <i>Mytilus galloprovincialis</i> | 276 | 2,14 | Sedano (1992) |
| <i>Venerupis pullastra</i> | 238-254 | 1,63-3,02 | Nóvoa (2007) |
| <i>Ruditapes decussatus</i> | 222 | 2,2 | Martínez <i>et al.</i> (2001) |

En la mayoría de los casos se asume que cuanto más corto es el período larvario, mayor es la supervivencia. Comparando el porcentaje de fijación, el más alto fue el de *S. marginatus* (53,2% de media), seguido por *E. siliqua* con una media del 42,3% y por último, *E. arcuatus* (15,6%). Las supervivencias de *S. marginatus* y *E. siliqua* no se diferencian significativamente, siendo algo menor en *E. siliqua*, ya que tarda una semana más en alcanzar la fijación. Por el contrario, entre estas dos especies y *E. arcuatus* sí que existen diferencias significativas. Hay una respuesta distinta en cuanto a la supervivencia en la fijación en las dos especies de *Ensis*. En estas tres especies existe una correlación entre el tiempo de desarrollo larvario (tiempo hasta la fijación) y la supervivencia larvaria, como la citada por Román (1989) en *Ostrea edulis*. Lépez *et al.* (2005) cultivando *E. macha* desde larva D hasta larva premetamórfica (15-20 días de cultivo) citan supervivencias que varían entre el 25 y el 50%. Delaunay *et al.* (1989) trabajando con el pectínido *Pecten maximus* encontraron también una gran variabilidad (aunque con supervivencias nunca superiores al 40%), mientras que Marty *et al.* (1992) indican que las mayores tasas de supervivencia se obtuvieron entre el segundo día y la fijación, con metamorfosis superiores al 80%. Cultivando *M. galloprovincialis*, Sedano (1992) obtuvo supervivencias desde el día 2 hasta el momento previo a la fijación entre el 14 y el 56%. Gallagher & Mann (1986) alcanzan supervivencias en *M. mercenaria* del 0,9 al 7% y en *C. virginica* del 0,01 al 10%. Nóvoa (2007) con *V. pullastra* cita rendimientos en criadero desde ovocito hasta metamorfosis del 51% a los 13-15 días en los desarrollos buenos y en los malos del 46% a los 18-22 días.

Además, la longitud y peso seco de ovocitos y larvas D van a influir en la supervivencia en la fijación. En *S. marginatus* cuanto mayor es el tamaño del ovocito y menor el peso seco, mejoran las tasas de supervivencia en la fijación. La longitud de las larvas D veliger presentan una correlación positiva con la supervivencia en la fijación.

En *E. siliqua* ni el diámetro ni el peso seco de los ovocitos influye en la supervivencia larvaria. En las larvas D, sólo los mayores pesos secos, explican altas supervivencias en la fijación. Mientras, en *E. arcuatus* con ovocitos de menor diámetro pero un elevado peso seco, se consiguen las mejores supervivencias en la fijación. En relación a las larvas D, a medida que aumenta su talla y peso seco, desciende la supervivencia en la fijación.

Parte de los datos aportados en el presente estudio se refieren a supervivencias desde ovocito, por lo que incluyen todo el desarrollo larvario y sus períodos más críticos donde la fuente energética es endotrófica: embriogénesis y la metamorfosis. Además, las diferentes escalas de experimentación imposibilitan, en muchos casos, un análisis comparativo entre resultados. El cultivo larvario en estas especies no presenta problemas significativos, no siendo uno de los pasos limitantes del cultivo. Si bien, las supervivencias larvarias en *E. arcuatus* son mejorables.

Cultivo postlarvario y de semilla

Una semana después de la fijación las postlarvas miden 861, 436 y 395 μm correspondiéndose con *E. arcuatus*, *S. marginatus* y *E. siliqua*, respectivamente. Al mes de vida *S. marginatus* alcanzó 2136 μm , seguida por *E. arcuatus* con 861 μm y por último, *E. siliqua* fue la que presentaba una menor longitud (652 μm). La talla alcanzada por las postlarvas de 1 mes de vida de *E. arcuatus* es similar a la mencionada por Darriba (2001), que daba una talla de 958 μm de longitud. A pesar de que las postlarvas de *S. marginatus* se fijan a una talla menor, tienen más tiempo desde la fijación hasta el mes de vida para crecer, coincidiendo además con la fase en la que se produce el alargamiento. Así, pueden alcanzar una mayor talla frente a las otras dos especies. Entre las dos especies de *Ensis* la diferencia puede deberse a la diferente talla de fijación.

A los 3 meses, *E. siliqua* es la especie que presenta mayor longitud, con casi 21 mm, frente a los 15 mm de *S. marginatus* y 11 mm de *E. arcuatus*. Darriba (2001), para la especie *E. arcuatus*, cita 30 mm a los 3 meses de vida. En *E. directus* los juveniles de 3 meses alcanzan 7-9 mm (Kenchington *et al.*, 1998) y en *E. macha* en este período alcanza 1 cm de longitud (López *et al.*, 2008).

Aunque hay diferencias entre las tres especies en longitud, el peso de *E. siliqua* y *S. marginatus* es estadísticamente similar. Esto es debido a las diferencias entre las especies, puesto que *S. marginatus* presenta una contribución mayor de la vianda al peso.

La supervivencia de postlarvas y semilla en las tres especies estudiadas es baja, situándose en torno al 5-10% a los 30 días de cultivo y a los 90 días entre el 2-5% con respecto a la fijación. Hay una fase crítica que se sitúa en torno a 1 mm de talla, produciéndose importantes mortalidades en esta fase. A partir de este momento la supervivencia se estabiliza. Esto ocurre también en otros solénidos, como en la especie *E. macha* en la que la supervivencia a los 50 días del cultivo de postlarvas es aproximadamente del 5% (Lépez *et al.*, 2005). En el momento en que se realizó este estudio las supervivencias eran bajas, pero posteriormente han mejorado hasta superar en *S. marginatus* el 35% de supervivencia a los 30 días de cultivo (observación personal).

Cultivo en el medio natural

La dificultad de obtención de estimaciones fiables de crecimiento de ejemplares salvajes en el medio natural con técnicas indirectas supone trabajar con semilla obtenida en criadero. Su trasvase al medio natural ha de realizarse con una talla adecuada para poder llevar a cabo un correcto seguimiento. La dificultad en el manejo de los solénidos, impuesta por el rápido y profundo enterramiento en el sustrato es un factor limitante en el muestreo de las jaulas.

En la experiencia de cultivo en el medio natural, la semilla de *S. marginatus* con un año de vida, alcanzó una talla media de 38 mm. A los dos años y medio de vida midieron $77,7 \pm 5,2$ mm, siendo una talla próxima a la comercial que se sitúa en 80 mm. A los tres años de vida, *S. marginatus* alcanza la talla comercial (80 mm) con $80,1 \pm 5,2$ mm. Ésto concuerda con los datos sin publicar procedentes de una experiencia anterior realizada con juveniles de 1 año y mantenida en recintos controlados en la que se alcanzaron $75,8 \pm 17,5$ mm de longitud a los 3 años de edad (Martínez-Patiño, comunicación personal).

El patrón de crecimiento de *S. marginatus* en el presente estudio es similar al encontrado por Maia *et al.* (2006a) con la técnica de los anillos externos y de la película de acetato (Tabla III.20). En todos los casos son necesarios tres años para superar la talla comercial de la especie.

Tabla III.20. Resultados del crecimiento en longitud durante los tres primeros años de vida en *Solen marginatus* con diferentes técnicas.

| Especie | Técnica | Talla 1 ^{er} año (mm) | Talla 2 ^o año (mm) | Talla 3 ^{er} año (mm) | Autores |
|----------------------|------------------|--------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|----------------------------|
| <i>S. marginatus</i> | Técnica directa | 38,5 | 67,1 | 80,1 | Presente estudio |
| <i>S. marginatus</i> | Película acetato | 36,4 | 62,1 | 84,7 | Maia <i>et al.</i> (2006a) |
| <i>S. marginatus</i> | Anillos externos | 36,5 | 61,6 | 83,3 | Maia <i>et al.</i> (2006a) |

La talla alcanzada a los 2 años de vida en *E. arcuatus* se situó entre los 90-100 mm (Darriba, 2001). Este dato es una estimación del crecimiento con juveniles procedentes de un banco marisquero sembrados en recintos controlados, en los que se supuso una edad inicial de un año. Según estos datos, a los 2 años y medio la longitud de estos ejemplares sería de 98 mm, aún ligeramente por debajo de la talla comercial. Robinson & Richardson (1998), utilizando la técnica de la película de acetato, citan una talla de 40 mm tras un año de crecimiento y de 80 mm a los 2 años en *E. arcuatus*. Gaspar *et al.* (1994) citan para *E. siliqua*, con la técnica de la película de acetato, una talla en el primer año de 80 mm, mientras que, analizando los anillos externos obtienen una talla de 55 mm (1 año).

La supervivencia a los seis meses de traslado de los juveniles de *E. arcuatus* procedentes del medio natural fue del 68,5% y a los doce meses la tasa se situó en el 56,8% de los individuos de partida, con 2 años de vida (Darriba, 2001). En esta experiencia se partió con ejemplares de un año estimado de vida. En nuestra experiencia con semilla de *S. marginatus* de cuatro meses de edad procedente de criadero, a los seis meses, el 81% de los individuos permanecían vivos y al año de siembra, el 71% de la semilla de partida. Aún así, la distinta talla inicial de siembra y la distinta edad de los ejemplares, imposibilita una comparación real de las experiencias entre estas dos especies.

La influencia de las condiciones ambientales en el crecimiento de los bivalvos ha sido citada por numerosos autores, siendo los parámetros más importantes la

temperatura y el alimento (Bayne & Newel, 1983), pero hay otros parámetros destacables como la salinidad. Ésta es la razón por la cual en el presente estudio se han considerado la temperatura, salinidad y concentración de clorofila “a”. Este último factor se considera un buen indicador de la cantidad de fitoplancton (Lalli & Parsons, 1997).

Los períodos de crecimiento coinciden con el momento en que en el medio natural comienza a aumentar la temperatura. Aunque éste no es el único factor que afecta al comienzo de la época de crecimiento, puesto que con valores de temperatura superiores durante el invierno, el crecimiento se detiene. La temperatura tiene un efecto combinado con la presencia de alimento en la columna de agua. En marzo-abril comienza a elevarse la temperatura del agua de mar coincidiendo con un primer pico de clorofila “a”, y sucediéndole al menos otro pico a lo largo del verano. El pico más significativo es el presente al inicio del otoño, momento a partir del cual se detiene el crecimiento.

La salinidad no afecta al crecimiento. Esta especie vive en las zonas internas de las rías, por lo que, normalmente está expuesto a cambios bruscos de salinidad. En el emplazamiento donde se realizó el estudio, la salinidad permaneció relativamente constante, variando entre 25 y 30‰. Los descensos fueron puntuales y durante un período limitado de tiempo. Únicamente alguno de los descensos bruscos coincidió con el período de crecimiento, por lo que el efecto sobre el crecimiento fue limitado. La mayor parte de las salinidades subóptimas para el crecimiento se produjeron en invierno, cuando no se observa crecimiento. Durante este período la interacción entre los distintos parámetros ambientales no puede ser determinada, ni cual tiene un efecto mayor.

En nuestro estudio se observa un marcado crecimiento estacional, según el cual *S. marginatus* en el medio natural crece entre los meses de marzo-abril hasta octubre-noviembre. A finales del otoño y durante el invierno éste se detiene. Maia *et al.* (2006a) citan para esta especie un estancamiento durante todo el otoño y parte del invierno, y un período de crecimiento que comienza en enero-febrero y se mantiene hasta septiembre.

El crecimiento de esta especie en el medio natural también puede estar influenciado por la maduración, pudiendo afectar desde el primer año de vida (da Costa *et al.*, 2008). En los bivalvos es común que se produzca una redistribución de energía del crecimiento somático a la producción de gametos, y esto puede determinar la tasa de crecimiento de los adultos en bivalvos (Bayne & Newell, 1983). Maia *et al.* (2006b) citan en la Ría de Aveiro una talla de primera maduración en machos de 44,7 mm y para hembras de 47,7 mm. Así, en el primer año de vida sólo los individuos mayores maduran. El gasto energético destinado a la reproducción durante el primer año de vida es pequeño, permitiendo que los individuos sigan creciendo durante ese verano. A partir de la segunda maduración (2º año de vida) se ve como el crecimiento es mucho menor, y se destinará mucha más energía en la formación de gametos.

La relación longitud-altura en *S. marginatus* es alométrica negativa, lo que significa que hay un progresivo engrosamiento de los individuos con la edad. Estos resultados concuerdan con lo descrito para *E. siliqua* por Gaspar (1996) y para *E. macha* por Barón *et al.* (2004). No obstante, Maia *et al.* (2006a) encontraron una relación alométrica positiva en *S. marginatus*, en la que la longitud aumentaría más a lo largo del tiempo que la altura. Por el contrario, *E. arcuatus* presenta una relación isométrica, en la que el incremento en longitud es proporcional al incremento en altura (Darriba, 2001).

El estudio de los distintos rangos de tallas en relación al peso es importante puesto que el exponente de ajuste del modelo potencial varía con la edad. La relación longitud-peso en *S. marginatus* es isométrica, con un amplio rango de tamaños estudiados de 1,1 a 91,4 mm de longitud. Martínez (2002) cita para esta especie una alometría negativa con ejemplares de 15 a 140 mm procedentes de semilla cultivada en criadero y de ejemplares capturados en el medio natural. Estos resultados también concuerdan con una relación alométrica negativa que Maia *et al.* (2006a) encuentran en los ejemplares de la Ría de Aveiro. Estudiando *E. macha* se encuentra una relación isométrica con individuos de 55 a 165 mm (Barón *et al.*, 2004). Así, en *E. arcuatus*, los individuos más jóvenes presentan un crecimiento alométrico negativo, con proporcionalmente un mayor crecimiento en longitud que en peso, mientras que después del primer año el crecimiento pasa a ser alométrico positivo (Darriba, 2001). Gaspar (2006) estudiando *E. siliqua* con un amplio rango de tallas, de 20 a 200 mm, obtuvo una relación alométrica negativa, encontrando Martínez (2002) la misma relación para esta

especie con ejemplares de entre 40 y 140 mm. Por el contrario, en *E. minor*, con ejemplares a partir de 60 mm, la relación encontrada era alométrica positiva (Casavola *et al.*, 1985; Valli *et al.*, 1985; Costa *et al.*, 1987).

Desoves procedentes de *Solen marginatus* cultivado en jaulas

Una vez los individuos de *S. marginatus* engordados en las jaulas alcanzaron los 3 años de edad, y coincidiendo con la época de madurez, se llevaron al criadero para ser utilizados como progenitores. Los desoves obtenidos han permitido cerrar el ciclo de cultivo para la especie *Solen marginatus*. Además, a través de distintas modificaciones en el manejo del cultivo, se ha podido aumentar la supervivencia en la etapa más crítica del cultivo, la fase de 1 mm, correspondiente a los 30 días de cultivo. Se ha pasado de una supervivencia a los 30 días desde la fijación del 16,5%, a una supervivencia media del 35%, con valores entre el 24 y el 46%. El cultivo de las postlarvas recién fijadas sin sustrato posibilita una limpieza más adecuada, así como el tamizado y eliminación de colas y ejemplares muertos o moribundos. Ésto limita la proliferación de agentes patógenos en el cultivo y evita el que se puedan dar condiciones anóxicas debido al sustrato.

Viabilidad del cultivo

Los resultados obtenidos en las distintas fases ponen de manifiesto la posibilidad de la obtención de semilla en criadero de las tres especies de solénidos. Es conveniente el perfeccionamiento de los protocolos de trabajo en criadero para la obtención masiva de larvas y semilla en instalaciones industriales, investigando los parámetros que afectan al crecimiento y a la supervivencia.

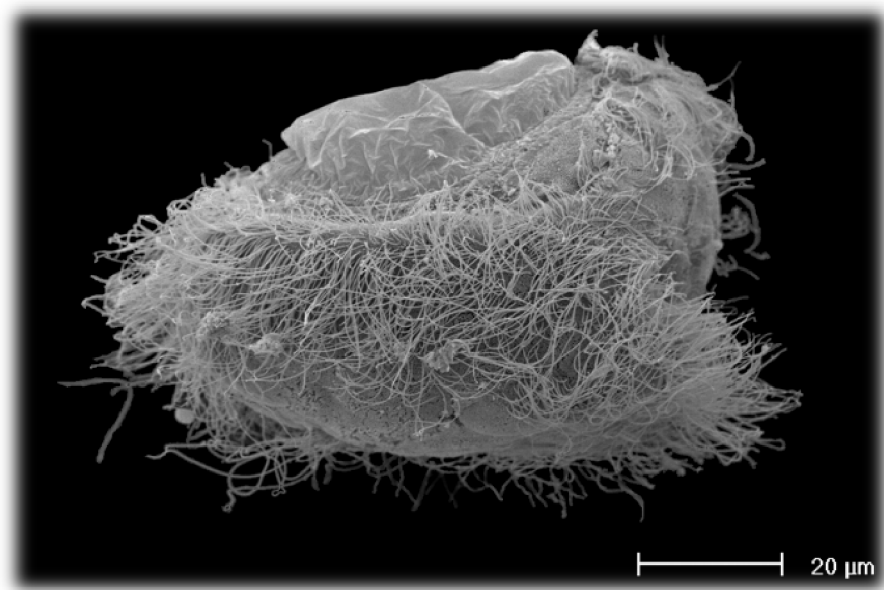
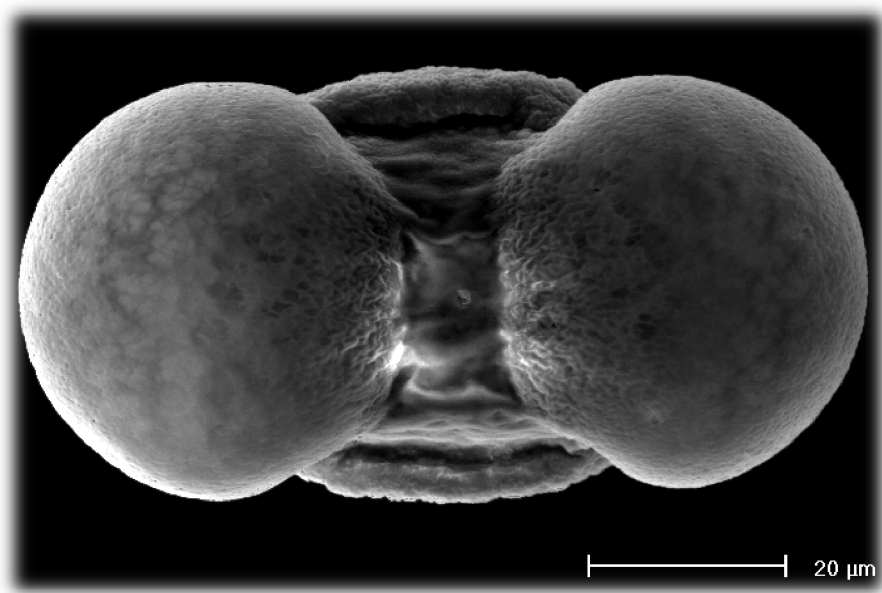
Las experiencias de acondicionamiento realizadas mostraron que es posible acondicionar las tres especies. La época más favorable para comenzar el acondicionamiento es cuando los ejemplares se encuentran en gametogénesis avanzada. Por el momento, el período del año en que se pueden obtener puestas es reducido. Se deberían hacer esfuerzos en investigación en este aspecto, estudiando factores que inciden en el ciclo reproductivo.

Los métodos de inducción a la puesta son satisfactorios en las tres especies, pudiendo mejorar el de *S. marginatus* para un mejor control de la obtención de ovocitos.

Estas especies no presentan problemas importantes en el cultivo larvario, si bien, la supervivencia larvaria en *E. arcuatus* es baja en relación con las otras dos especies.

La fase más crítica del cultivo de estas especies es el cultivo de postlarvas, donde la mortalidad es elevada hasta alcanzar la talla de 1 mm. Además, la necesidad de sustrato a partir de una determinada talla, hace que el manejo sea costoso, siendo esta fase del cultivo la que necesita un mayor desarrollo. En esta fase se debe investigar los requerimientos de alimentación y sustrato de las especies para maximizar la supervivencia y mejorar así los rendimientos del cultivo.

Los resultados de las siembras con *S. marginatus* suponen que se puede alcanzar la talla comercial en un período de tiempo razonable (3 años) y con buenas tasas de supervivencia. Además, el haber cerrado el ciclo de cultivo con la especie *S. marginatus* hace que esta especie se pueda añadir al catálogo de especies cultivables para la acuicultura.



IV. Capítulo II: Embriología y desarrollo larvario

IV.1.- INTRODUCCIÓN

Una identificación adecuada de las larvas y postlarvas de bivalvos en muestras de plancton y bentos es esencial para la investigación, tanto básica como aplicada, de los ambientes estuarinos y de mar abierto (Gustafson & Lutz, 1992). Asimismo, el estudio de larvas del plancton es crucial para conocer la dispersión larvaria, la fijación y los niveles de reclutamiento, así como las tasas de crecimiento de los bivalvos infaunales (Gribben & Hay, 2003). A principios de los años 70 se consideraba que la identificación de larvas de bivalvos sólo se podía verificar con técnicas directas como el cultivo en criadero (Chanley & Andrews, 1971). Más recientemente, el uso de características morfométricas de la concha como forma, largo o ancho, se han utilizado en la identificación de las larvas (Dinamani, 1973; Hooker, 1997). Sin embargo, algunas especies cercanas presentan estructuras valvares similares, lo que dificulta la identificación (Le Pennec, 1980; Fuller & Lutz, 1989), siendo ésto especialmente problemático si varias especies de una misma familia habitan en la misma área. En algunos estudios sobre el desarrollo larvario de moluscos bivalvos, se ha propuesto que la estructura y morfología interna de valvas y partes blandas de las larvas muestren diferencias específicas (Elston, 1980; Hodgson & Burke, 1988; Cragg, 1985, 1989). Además, los caracteres antes mencionados, junto con características de fácil observación al microscopio óptico, pueden aportar combinaciones de caracteres que faciliten la correcta identificación de larvas.

Además de estos métodos clásicos, en la actualidad podemos encontrar una serie de métodos alternativos de identificación que presentan ventajas en cuanto a rapidez y especificidad, como serían los métodos moleculares y bioquímicos, basados en la tecnología del ADN y en la separación de alozimas y de otras proteínas (Miller *et al.*, 1991; Olson *et al.*, 1991; Hu *et al.*, 1992; Coffroth & Mulawka, 1995; Medeiros-Bergen *et al.*, 1995; Toro, 1998; André *et al.*, 1999; Hare *et al.*, 2000), métodos inmunológicos basados en la obtención de anticuerpos policlonales (Paugam *et al.*, 2000) y monoclonales (Demers *et al.*, 1993; Lorenzo *et al.*, 2003, 2005). Pero estos métodos no aportan ventajas para la mejora del cultivo de larvas en criadero, ya que no permiten conocer la morfología y estructura de las larvas, lo cual posibilitaría mejorar su manejo en criadero, además de identificar posibles malformaciones.

La descripción del desarrollo larvario de numerosas especies de Eulamellibranchia se ha realizado proporcionando conocimientos básicos para la acuicultura o para la identificación de sus estadios larvarios en el plancton (Loosanoff & Davies, 1963; Loosanoff *et al.*, 1966; Sastry, 1979). El estudio de diferentes aspectos de larvas y postlarvas con microscopía electrónica de barrido se ha llevado a cabo en diversas especies de Eulamellibranchia: Corbiculidae (Byrne *et al.*, 2000), Dreissenidae (Martel *et al.*, 1995), Hiatellidae (Gribben & Hay, 2003), Mactridae (Short & Tamm, 1991), Mesodesmatidae (Redfearn, 1982, 1987), Mytilidae (Redferan *et al.*, 1986; Fuller & Lutz, 1989; Bellolio *et al.*, 1996; Hanyu *et al.*, 2001), Ostreidae (Le Pennec & Coatanea, 1985; Hu *et al.*, 1993; Chaparro *et al.*, 1999, 2001), Pectinidae (Cragg, 1985, 1989; Bellolio *et al.*, 1993; Benninger *et al.*, 1994; Casse *et al.*, 1998), Solemyidae (Gustafson & Reid, 1986; Gustafson & Lutz, 1992), Margaritiferidae (Araujo & Ramos, 1998), Semelidae (Raleigh & Keegan, 2007) y Veneridae (Goodsell *et al.*, 1992; Mouëza *et al.*, 1999, 2006; Evseev *et al.*, 2001). Sin embargo, el desarrollo embrionario no puede estudiarse en detalle mediante la microscopía óptica, y muchos estudios de patrones de desarrollo en bivalvos carecen de descripciones de los primeros estadios (Verdonk & Van den Biggelaar, 1983).

En los bivalvos la concha larvaria se denomina prodisoconcha. En las especies que presentan un desarrollo planctotrófico ésta se compone de dos regiones: prodisoconcha I (pI) y prodisoconcha II (pII) (Ockelmann, 1965). La pI aparece muy pronto en el desarrollo y está secretada por la glándula de la concha y el epitelio del manto, justo después del estadio de trocófora y al principio del estadio de larva D veliger (Carriker & Palmer, 1979). A continuación, se secreta la pII cuando la larva D comienza a alimentarse. Después de la fijación y metamorfosis, cuando la larva veliger reabsorbe el velo y se transforma en juvenil, el manto inicia la secreción de la disoconcha (D).

El objeto de este capítulo es describir, con microscopía óptica y microscopía electrónica de barrido (MEB), el patrón de desarrollo de los solénidos *Ensis arcuatus*, *Ensis siliqua* y *Solen marginatus* desde la puesta hasta la metamorfosis. La finalidad de este estudio, además de una posible aplicación a la identificación de muestras de plancton y bentos, es conocer en profundidad los embriones y las larvas de las tres especies de solénidos con el fin de mejorar su cultivo en criadero.

IV.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

IV.2.1.- Obtención de gametos y cultivo larvario

Se obtuvieron y cultivaron las larvas según lo descrito en los apartados III.2.4. y III.2.5. Se tomaron muestras de los diferentes estadios embrionarios y larvarios para su observación *in vivo* al microscopio óptico y para su procesado al microscopio electrónico de barrido (MEB). Las muestras de embriología se tomaron cada hora hasta la blástula y a partir de este momento cada dos horas, debido a que los cambios morfológicos son más lentos a partir de ese estadio, hasta que aparece la larva D veliger. A lo largo del cultivo se midieron la longitud y la altura de las diferentes formas larvarias.

IV.2.2.- Procesado para microscopía electrónica de barrido (MEB)

Las muestras se fijaron con glutaraldehído al 2,5% en tampón de cacodilato sódico 0,1 M, lavándose posteriormente en tampón de cacodilato sódico. Las muestras se postfijaron en tetróxido de osmio tamponado al 1%, se lavaron con tampón y se deshidrataron en serie de alcoholes de graduación creciente (Esquema IV.1). Posteriormente, se hizo una sustitución en escala de amiloacetato-etanol para continuar desecando, montándose las muestras sobre soportes específicos (*stubs*) y se recubrieron con oro, para visualizar la muestra al microscopio.

Esquema IV.1. Protocolo de preparación de muestras para microscopía electrónica de barrido.

Fijación

Se realiza en cabina de gases el siguiente proceso:

1. Fijar la muestra en glutaraldehído al 2,5% en tampón cacodilato 0,1 M durante 4 h a 4°C.
2. Realizar varios lavados con el tampón cacodilato (3-12 h), también en nevera.
3. Postfijar en tetróxido de osmio (OsO_4) al 1% en el mismo tampón, durante 1 h a 4°C.
4. Lavar de nuevo con tampón cacodilato. La muestra queda lista para la deshidratación.

Deshidratación

Lavar con agua destilada para eliminar sales y otros electrolitos. A continuación, el agua de estos tejidos ha de ser eliminada.

5. Comenzar con etanol al 30% durante 15 min.
6. Llevar a cabo la siguiente escala de etanoles:
 - 50% - 2 x 15 ó 3 x 10 min.
 - 70% - 2 x 15 ó 3 x 10 min.
 - 80% - 2 x 15 ó 3 x 10 min.
 - 90% - 2 x 15 ó 3 x 10 min.
 - 100% - 3 x 15 min.

Sustitución

Sustituir el etanol por un líquido que sea miscible con el CO_2 líquido, para llevar a cabo la desecación total en la cámara de Punto Crítico.

7. Llevar a cabo la siguiente escala Amiloacetato - Etanol:
 - 1:3 - 2 x 15 ó 3 x 10 min.
 - 2:2 - 2 x 15 ó 3 x 10 min.
 - 3:1 - 2 x 15 ó 3 x 10 min.
 - Amiloacetato 100% - 3 x 15 min.

Desecación

Nos permite mantener la estructura intacta al sustituir los líquidos internos por gas, usando el Desecador de Punto Crítico.

Montaje en soportes específicos

Para que las muestras puedan ser observadas al microscopio, deben hacerse conductoras y estar montadas en el portamuestras adecuado para el microscopio.

8. Usar discos de grafito para adherir la muestra, en la orientación adecuada, al portamuestras de aluminio.

Recubrimiento con oro

Es el paso definitivo para poder llevar a cabo el estudio de la muestra al microscopio. Se ha utilizado un microscopio Philips XL30 para las muestras recubiertas en oro y un microscopio JEOL JSM-6700F con *cryotransfer* para las muestras observadas por *cryofocusing*.

IV.3.- RESULTADOS

IV.3.1.- Navaja (*Ensis arcuatus*)

El ovocito sin fecundar es marrón, esférico, con microvellosidades y posee un diámetro de $70,9 \pm 4,3 \mu\text{m}$ (Fig. IV.1 y IV.9). En la tabla IV.1 se muestran los diferentes estadios embrionarios de *E. arcuatus* y los tiempos en los que estos aparecen. La segmentación es espiral, desigual y ligeramente asincrónica a partir del estadio de 4 células. Los huevos presentan una cubierta gelatinosa de $1 \mu\text{m}$ de espesor. Tras 20 minutos a partir de la fecundación se produce la extrusión del primer corpúsculo polar (Fig. IV.2, IV.10 y IV.11), produciéndose en total la extrusión de dos, no siendo siempre obvia la extrusión del segundo, ambos con un tamaño aproximado de $8 \mu\text{m}$ (Fig. IV.12). Precediendo a la primera división se empieza a formar un lóbulo polar o lóbulo vitelino de grandes dimensiones en el polo vegetal del huevo. Durante la división que dará lugar al estadio trébol, esta protuberancia se va constriñendo gradualmente hasta quedar unido por un fino tallo al resto del huevo, que se divide en dos blastómeros nucleados de igual tamaño ($30 \mu\text{m}$) y en un lóbulo polar anucleado ($50 \mu\text{m}$) (Fig. IV.3, IV.13 y IV.14). A continuación, el lóbulo polar se reincorpora al blastómero al que aún está unido, obteniéndose un estadio de dos células con dos blastómeros desiguales, uno de mayor tamaño ($60 \mu\text{m}$) fusionado al lóbulo polar, denominado CD, y uno más pequeño de unos $50 \mu\text{m}$, denominado AB (Fig. IV.4 y IV.15). El estadio de 2 células se alcanza en 1 hora post-fertilización (hpf) y tiene un corpúsculo polar en el plano de división.

Tabla IV.1. Estadios embrionarios y larvarios en *Ensis arcuatus*.

| Tiempo desde fertilización | Estadio |
|----------------------------|-----------------------------------|
| 0 h | Huevo sin fecundar |
| 1 h | Estadio de 2 células |
| 1 h 30 min | Estadio de 4 células |
| 2 h | Estadio de 8 células |
| 4 h | Estadio de 16 células |
| 6 h | Estadio de 32 células |
| 8-12 h | Blástula |
| 16 h | Gástrula |
| 19 h | Trocófora |
| 20-24 h | Transición de trocófora a larva D |
| 30 h | Larva D |
| 7 días | Larva umbonada |
| 14 días | Pediveliger |
| 20 días | Metamorfosis y fijación |

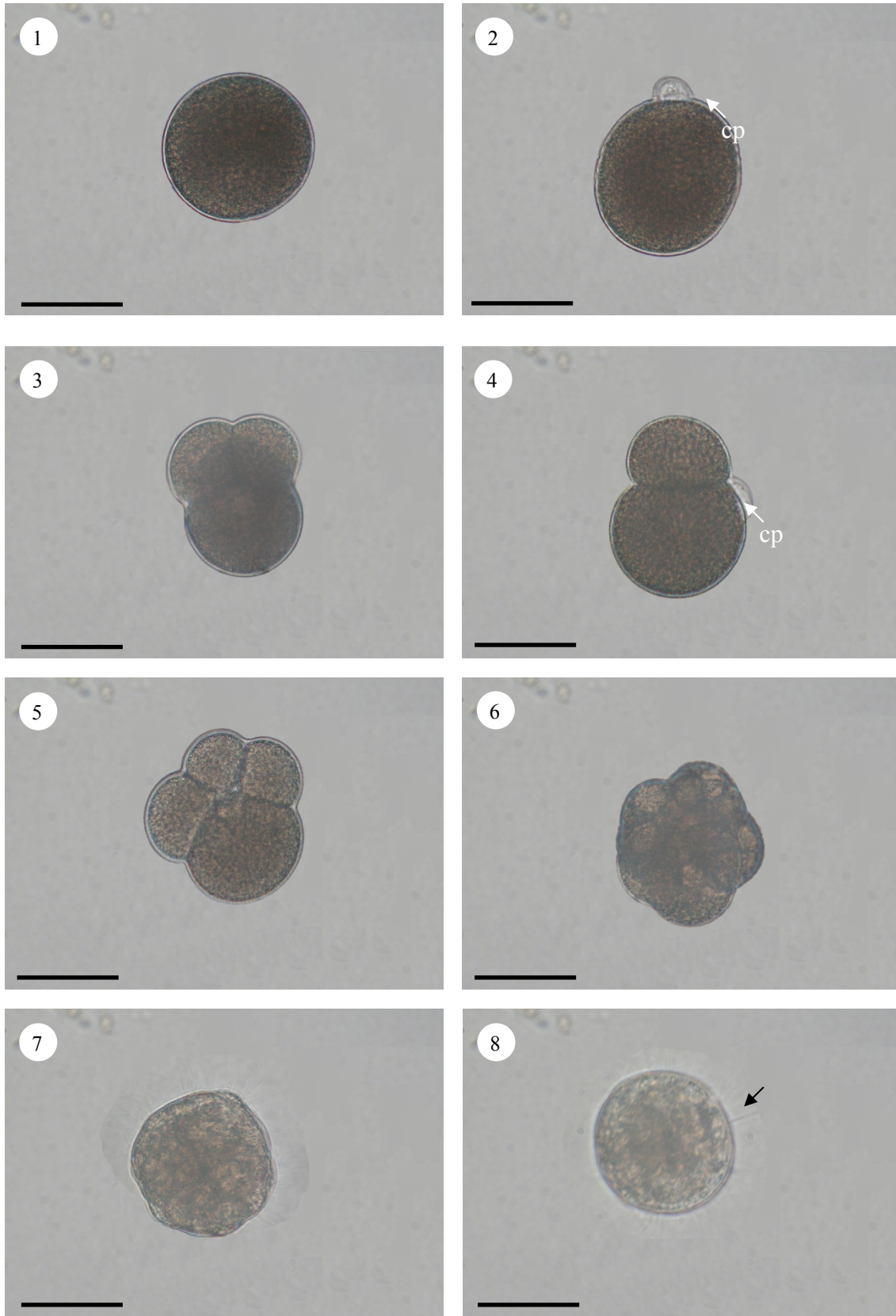


Fig. IV.1-8. Fotografías al microscopio óptico del desarrollo embrionario de *Ensis arcuatus*. 1. Ovocito sin fecundar. 2. Huevo fecundado comenzando a extruir el corpúsculo polar (cp). 3. Estadio trébol. 4. Estadio de 2 células. 5. Estadio de 4 células. 6. Estadio de 8 células. 7. Gástrula. 8. Trocófora, con penacho apical (flecha). Barra de escala equivalente a 50 μ m.

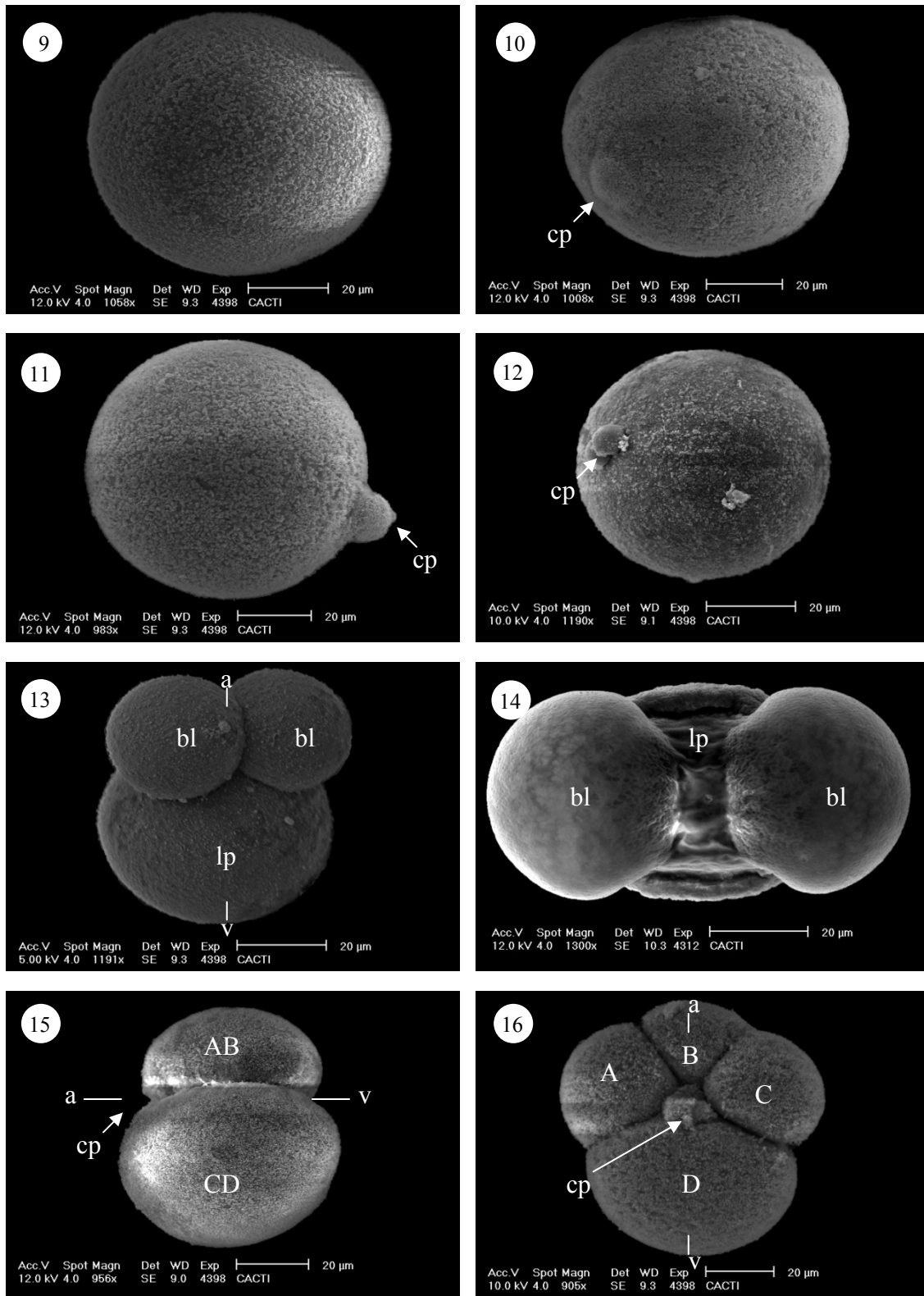


Fig. IV.9-16. Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo embrionario de *Ensis arcuatus*. Eje animal-vegetal (a-v) 9. Ovocito sin fecundar. 10. Huevo fecundado comenzando a extruir el corpúsculo polar (cp). 11. Extrusión del corpúsculo polar (cp). 12. Huevo con 2 corpúsculos polares (cp). 13. Formación del lóbulo polar (lp), estadio trébol, mostrando los 2 blastómeros (bl). 14. Estadio trébol, vista desde el polo animal. 15. Estadio de 2 células, vista lateral. 16. Estadio de 4 células, vista lateral.

En las figuras IV.5, IV.16 y IV.17 se puede ver cómo finalmente se alcanza el estadio de 4 células, con 3 blastómeros iguales (A, B y C) y uno mayor que es el D, mostrando 2 corpúsculos polares. A las 2 hpf se alcanza el estadio de 8 células, en el que los 7 micrómeros se van disponiendo en el polo animal sobre un macrómero, estadio en el que aún se pueden observar los corpúsculos polares (Fig. IV.6 y IV.18), y a las 4 hpf la mayor parte de los individuos se encuentran en estadio de 16 células (Fig. IV.19). La figura IV.20 se corresponde con el estadio que va de 32 a 64 células, en el que, poco a poco, se va recubriendo el macrómero por los micrómeros hasta quedar totalmente envuelto, dando lugar entre las 8-12 hpf al estadio de blástula, que comienza a estar ciliada, siendo de tipo esteroblástula (Fig. IV.21). Esta blástula es el primer estadio móvil del desarrollo. La blástula posee aún la envuelta de fertilización que, poco a poco, se va desprendiendo.

Mediante epibolia se llega a una gástrula ciliada, con cilios de unos 10-12 μm de longitud (Fig. IV.7 y IV.22). El blastoporo inicialmente se sitúa en el polo vegetal, pero a lo largo de la gastrulación se va desplazando anteriormente hacia la parte ventral del embrión. La gástrula tardía posee un blastoporo circular rodeado por unos pocos cilios, que darán lugar a la prototroca, y en la parte dorsal aparece una invaginación opuesta al blastoporo, la glándula de la concha o “shell-field” (Fig. IV.23).

Esa gástrula se transformará en una trocófora piriforme ciliada a las 19 horas post-fertilización (hpf), de 60 μm aproximadamente de longitud apico-basal, que nada activamente en la columna de agua (Fig. IV.8 y IV.25). La trocófora posee una región ciliada a modo de corona, la prototroca, que divide la trocófora en dos regiones. La región posterior a la prototroca está ocupada por el blastoporo, que da lugar a la boca en la parte ventral y la glándula de la concha, situada en la parte dorsal y rodeada por un penacho de cilios (Fig. IV.26). El material evaginado por la glándula de la concha va apareciendo y se extiende cubriendo los segmentos izquierdo y derecho conectados por una banda más gruesa, que es la primera charnela. Detrás de esto, en la región postero-dorsal, un mechón de cilios dorsales al ano forma la telotroca. La región anterior constituye una zona aplanada con un largo mechón apical o penacho apical (metatroca), situado en el centro, y compuesto por un conjunto de cilios asociados con una longitud de 12 μm (Fig. IV.24).

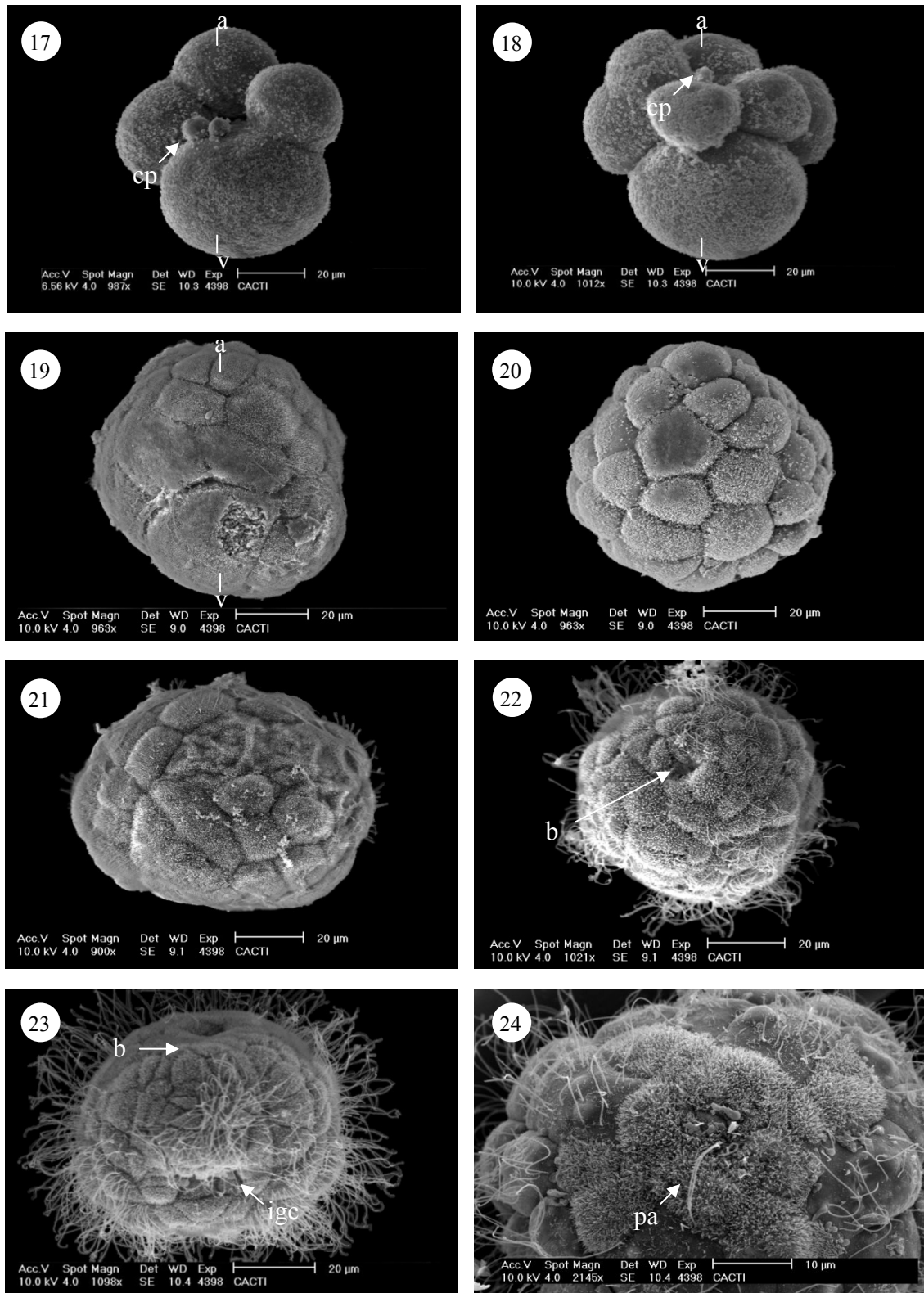


Fig. IV.17-24. Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo embrionario de *Ensis arcuatus*. Eje animal-vegetal (a-v). 17. Estadio de 4 células, con 2 corpúsculos polares (cp), vista lateral. 18. Estadio de 8 células, vista lateral. 19. Estadio de 16 a 32 células. 20. Estadio de 32 a 64 células. 21. Blástula. 22. Gástrula, mostrando el blastoporo (b). 23. Gástrula tardía, mostrando el blastoporo (b) y la invaginación de la glándula de la concha (igc). 24. Vista apical de la trocófora, mostrando el penacho apical (pa), y las células de la glándula de la concha.

Esta trocófora evolucionará a las 30 hpf a una larva D veliger, con una talla de $109,4 \pm 10,0 \mu\text{m}$, creciendo la prodisoconcha I hasta quedar unidas ambas valvas y recubrir por completo las partes blandas de la larva (Fig. IV.27 a IV.29, y IV.33). En las preparaciones de microscopía electrónica de barrido (MEB), en la larva se evidencia una película arrugada que recubre a las valvas apareciendo en los primeros días más despegada y que, a medida que avanza el cultivo, se va pegando más a la capa inferior. Si se retira esta película por medios mecánicos, la prodisoconcha aparece debajo. Debido a esta película, el tiempo de calcificación no se ha podido observar. Para tratar de determinar si la presencia y apariencia de esta membrana era un artefacto debido al procesamiento de preparación de las muestras para el microscopio electrónico, se realizaron preparaciones complementarias con otras especies con los mismos días tras la fertilización siguiendo el mismo protocolo de procesamiento para MEB. Se observó una estructura similar en las larvas de almeja babosa (*Venerupis pullastra*) (Fig. IV.37), y la prodisoconcha sin ésta película en almeja fina (*Ruditapes decussatus*) (Fig. IV.38). La confirmación de la estructura de la prodisoconcha de *E. arcuatus* se realizó con larvas vivas de 5 días según la técnica de “cryofocusing”, por la que se congelan en nitrógeno líquido larvas vivas para evitar modificar las estructuras larvarias con el procesamiento para MEB. Con esta técnica se observó la prodisoconcha I y II totalmente calcificadas, y no se aprecia la membrana (Fig. IV.32). La prodisoconcha I tiene su característico aspecto punteado, y la prodisoconcha II está formada por anillos concéntricos de crecimiento. Por lo tanto, el aspecto de la prodisoconcha observada con el procesamiento de MEB en *E. arcuatus* y *V. pullastra* es un artefacto debido al procesamiento de las muestras, dado que el periostraco no está en contacto directo con la prodisoconcha.

El velo es una corona ciliada ovalada con varias filas de cilios de unos $10 \mu\text{m}$, y se puede observar a partir del estadio de larva D veliger. Mientras la mayoría acaba en un extremo puntiagudo, con un grosor no superior a los 100 nm , algunos cilios terminan en unas papilas redondeadas a modo de remo denominadas “paddle cilia” o “discocilia”, con un diámetro de $1 \mu\text{m}$ (Fig. IV.30 y IV.31). El detalle de las papilas muestra los extremos de los cilios totalmente enrollados. En algunas de las larvas D recién formadas se puede apreciar un flagelo de unas $30\text{-}50 \mu\text{m}$ en la mitad del velo, que se pierde en los días posteriores.

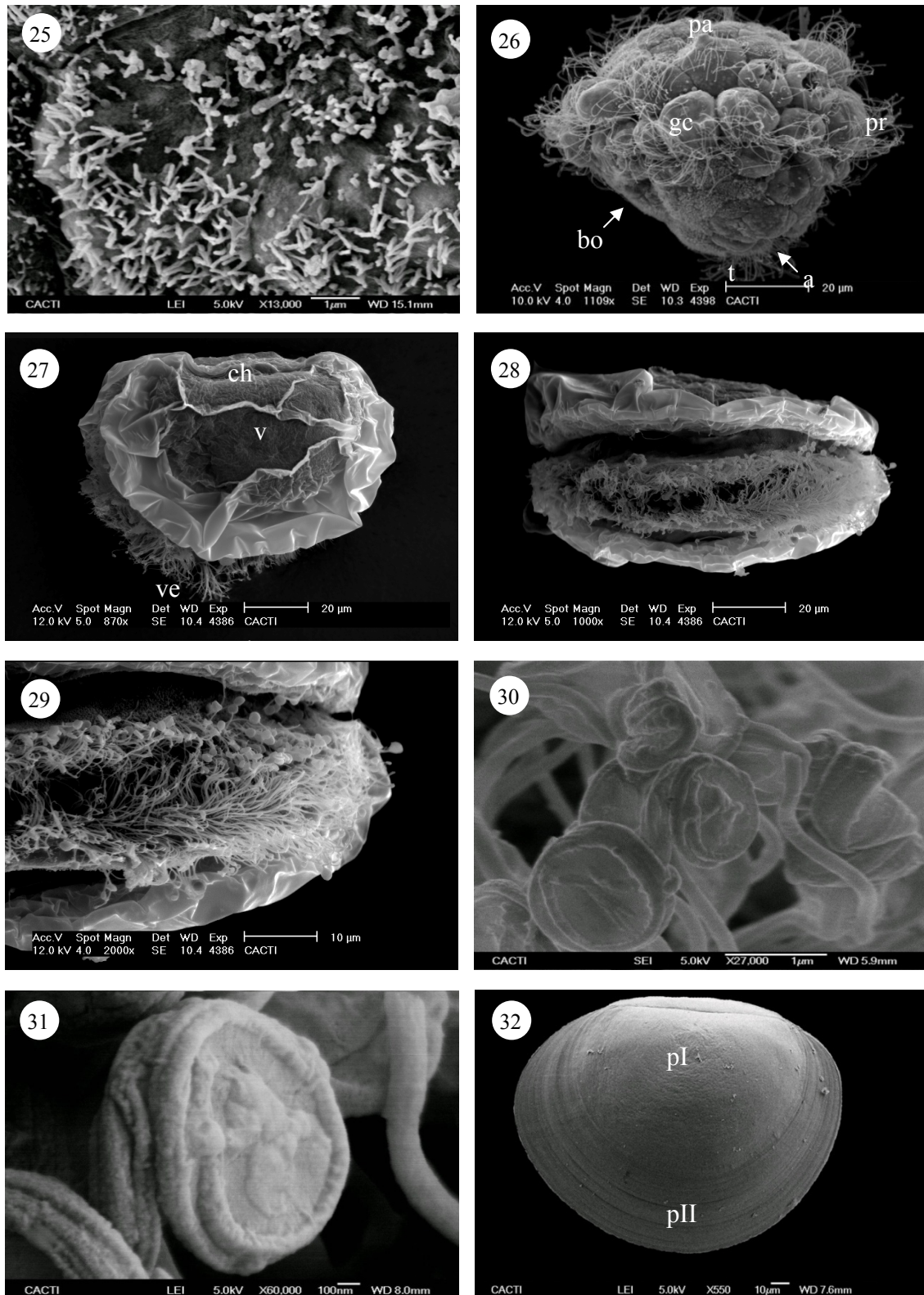


Fig. IV.25-32. Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo larvario de *Ensis arcuatus*. 25. Detalle de las microvelosidades presentes en la superficie de la trocófora. 26. Trocófora, comienza a aparecer la glándula de la concha (gc). Muestra la boca (bo), ano (a), telotroca (t), prototroca (pr) y penacho apical (pa). 27. Larva D veliger de 5 días post-fertilización (dpf) mostrando el velo (ve), valvas (v) y charnela (ch). 28. Larva D veliger de 5 días mostrando las valvas abiertas. 29. Detalle del velo. 30. Papilas de los cilios del velo. 31. Detalle de una papila, mostrando el extremo enrollado. 32. Larva D veliger de 5 dpf, según la técnica de “cryofocusing”, mostrando la prodisoconcha I (pI) y la II (pII).

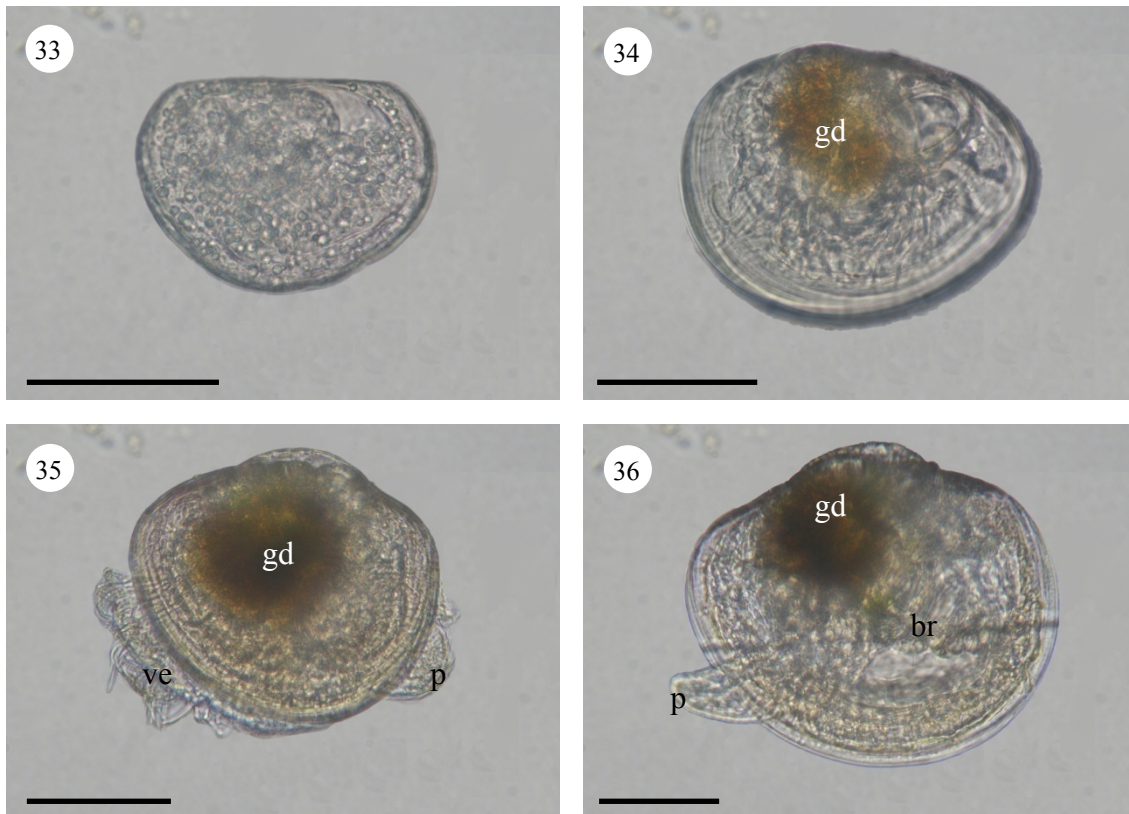


Fig. IV.33-36. Fotografías al microscopio óptico del desarrollo larvario de *Ensis arcuatus*. 33. Larva D veliger, de 1 día post-fertilización (dpf). 34. Larva umbonada de 7 dpf; glándula digestiva (gd). 35. Pediveliger de 14 dpf; velo (ve); pie (p). 36. Postlarva de 20 dpf; branquias (br). Barra de escala equivalente a 100 μm .

Al microscopio óptico se observa que la larva D veliger presenta un aparato digestivo totalmente desarrollado a partir de las 30 hpf. Asimismo, se puede observar una boca, un esófago corto y un estómago seguido de un intestino que desemboca en el ano. Este ano tiene en sus inmediaciones unos cilios simples formando un mechón post-anal. La cavidad del manto es visible en este momento.

A partir de los 7 días post-fertilización (dpf) la larva comienza a umbonarse con una longitud de $178,0 \pm 19,7 \mu\text{m}$ (Fig. IV.34), alcanzando el estadio de pediveliger ($283,1 \pm 30,0 \mu\text{m}$) a los 14 dpf (Fig. IV.35 y IV.39), en el que la larva reptaba con el pie ciliado, captura alimento y nada con el velo. Poco a poco, el velo se pierde o se reabsorbe apareciendo los filamentos branquiales. La fijación se produce a los 20 dpf con una talla de $378,8 \pm 37,1 \mu\text{m}$ (Fig. IV.36 y IV.40). En la postlarva se puede diferenciar perfectamente la escultura punteada de la prodisoconcha I y el crecimiento en anillos concéntricos de la prodisoconcha II, además de apreciarse el límite con la disoconcha (Fig. IV.41 y IV.42). En este estadio las preparaciones ya han perdido esa película que aparecía en los distintos estadios de las larvas veliger.

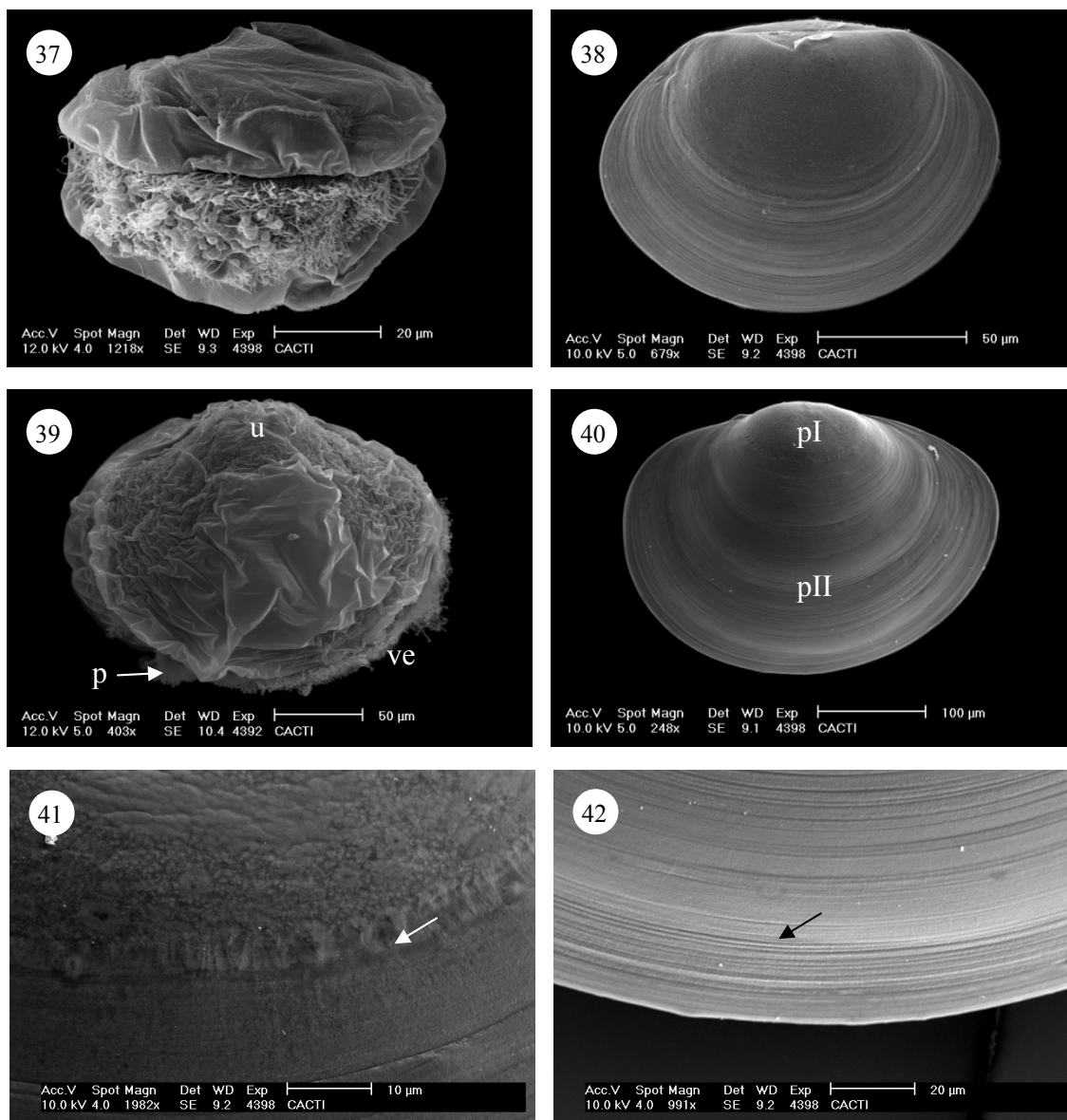


Fig. IV.37-42. Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo larvario de *Ensis arcuatus*, *Venerupis pullastra* y *Ruditapes decussatus*. 37. Larva de 6 dpf de almeja babosa (*V. pullastra*). 38. Larva de 6 dpf de almeja fina (*R. decussatus*). 39. Pediveliger de navaja 14 dpf, mostrando el umbo (u), el velo (ve) y el pie (p). 40. Postlarva de navaja de 20 dpf, mostrando la pI y pII. 41. Detalle de la prodisoconcha I, y la transición a la prodisoconcha II (flecha). 42. Detalle de la prodisoconcha II, y límite con la disoconcha (flecha).

IV.3.2.- Longueirón (*Ensis siliqua*)

El ovocito sin fecundar es esférico y posee un diámetro de $99,3 \pm 3,2 \mu\text{m}$, careciendo de envuelta. Una vez los ovocitos son fecundados, aparece una envuelta de aproximadamente $1 \mu\text{m}$ de espesor que lo rodea (Fig. IV.43). Los espermatozoides poseen una cabeza de unos $5 \mu\text{m}$ de largo y unos $2 \mu\text{m}$ de ancho en la base, con un acrosoma y con mitocondrias esféricas en la base (Fig. IV.53 y IV.54). El flagelo del espermatozoide mide aproximadamente $50 \mu\text{m}$ de longitud. A los 20 minutos tras la

fertilización se observa cómo los huevos comienzan a extruir los corpúsculos polares (Fig. IV.44 y IV.52). Los tiempos de los diferentes eventos del desarrollo embrionario y larvario se detallan en la tabla IV.2. A continuación comienza la primera división, pasando primero por el estadio trébol (Fig. IV.45), en el que los blastómeros son nucleados y el lóbulo polar anucleado como se observa al microscopio óptico (Fig. IV.46 y IV.47). El resultado es la obtención de 2 células, un macrómero de unos 60 μm y un micrómero de unos 45 μm (Fig. IV.48 y IV.55). El estadio de 4 células se alcanza tras 1 hora y 30 minutos, constando de un macrómero y 3 micrómeros (Fig. IV.49 y IV.56), en el que se puede observar el corpúsculo polar justo bajo el micrómero B. A partir de este estadio, el nivel de asincronía va aumentando. A las 2 hpf se puede observar el estadio de 8 células, con 7 micrómeros dispuestos en el polo animal a modo de gorra sobre el macrómero (Fig. IV.50 y IV.57). A medida que el número de células aumenta, los micrómeros van cubriendo el macrómero, y a las 3 hpf se llega al estadio de 16 células (Fig. IV.59). Posteriormente, aumentando más el número de células, se hace difícil precisar el número exacto, tanto al microscopio óptico como con MEB (Fig. IV.58 y IV.60).

La blástula en *E. siliqua* es el primer estadio embrionario ciliado, y por lo tanto, que presenta movilidad (Fig. IV.63). La blástula da lugar a una gástrula ciliada, que presenta cilios de mayor longitud que la blástula, y posee un blastoporo (Fig. IV.61 y IV.64). La envuelta de fertilización se sigue manteniendo hasta el final de la gástrula.

Tabla IV.2. Estadios embrionarios y larvarios en *Ensis siliqua*.

| Tiempo desde fertilización | Estadio |
|----------------------------|-----------------------------------|
| 0 h | Huevo sin fecundar |
| 1 h | Estadio de 2 células |
| 1 h 30 min | Estadio de 4 células |
| 2 h | Estadio de 8 células |
| 3 h | Estadio de 16 células |
| 4 h | Estadio de 32 células |
| 5 h 30 min | Blástula |
| 6 h 30 min | Gástrula |
| 12 h | Trocófora |
| 16 h | Transición de trocófora a larva D |
| 24 h | Larva D |
| 5 días | Larva umbonada |
| 10 días | Pediveliger |
| 14 días | Metamorfosis y fijación |

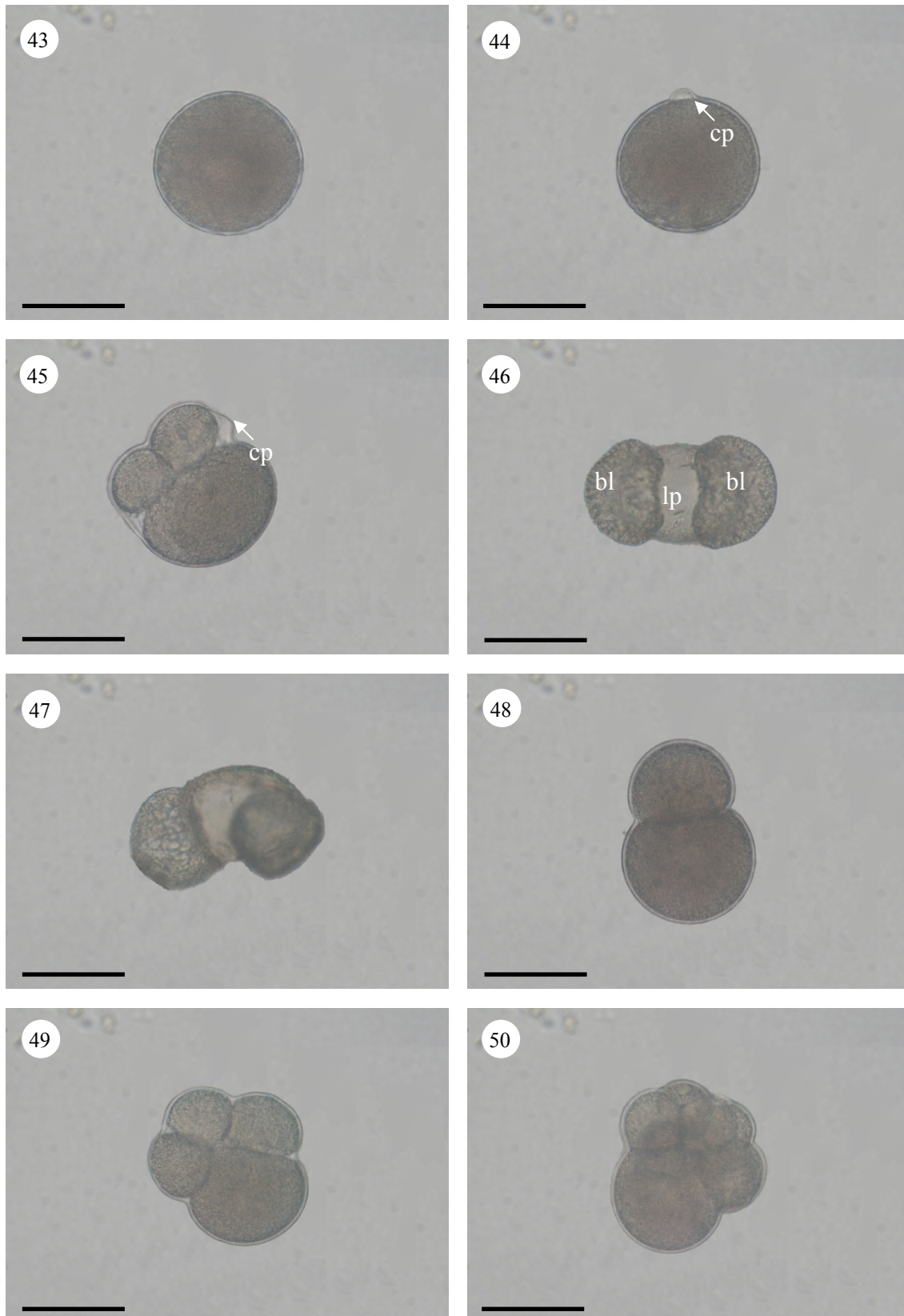


Fig. IV.43-50. Fotografías al microscopio óptico del desarrollo embrionario de *Ensis siliqua*. 43. Ovocito sin fecundar. 44. Huevo fecundado comenzando a extruir el corpúsculo polar (cp). 45. Estadio trébol, vista lateral. 46. Estadio trébol, vista desde el polo animal, mostrando los blastómeros nucleados (bl) y el lóbulo polar (anucleado) (lp). 47. Estadio trébol. 48. Estadio de 2 células. 49. Estadio de 4 células. 50. Estadio de 8 células. Barra de escala equivalente a 50 μm .

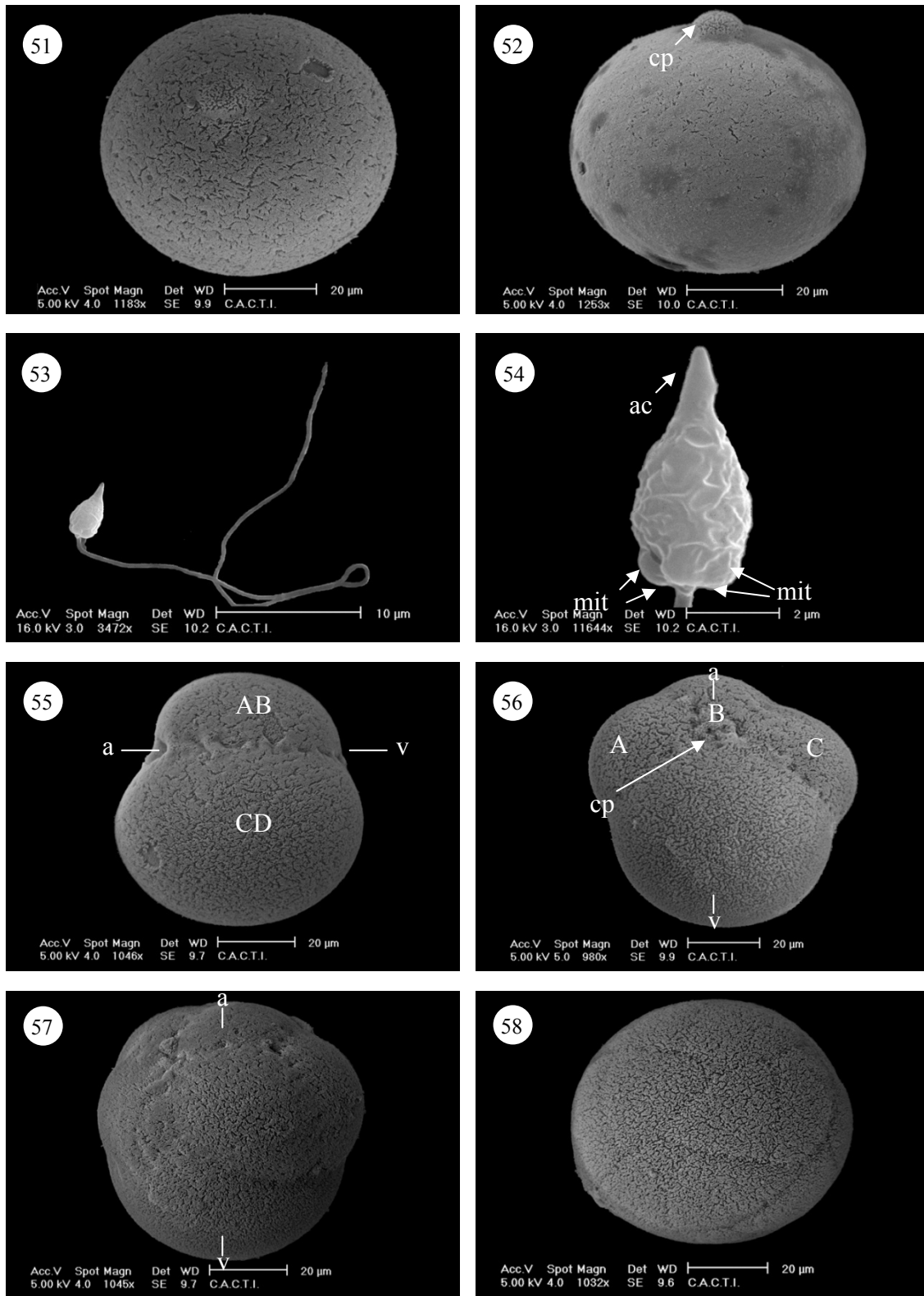


Fig. IV.51-58. Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo embrionario de *Ensis siliqua*. Eje animal-vegetal (a-v) 51. Ovocito sin fecundar. 52. Huevo fecundado comenzando a extruir el corpúsculo polar (cp). 53. Espermatozoide. 54. Detalle de la cabeza del espermatozoide, mostrando el acrosoma (ac) y las mitocondrias (mit). 55. Estadio de 2 células, vista lateral. 56. Estadio de 4 células, vista lateral. 57. Estadio de 8 células, vista lateral. 58. Estadio de 16 a 32 células.

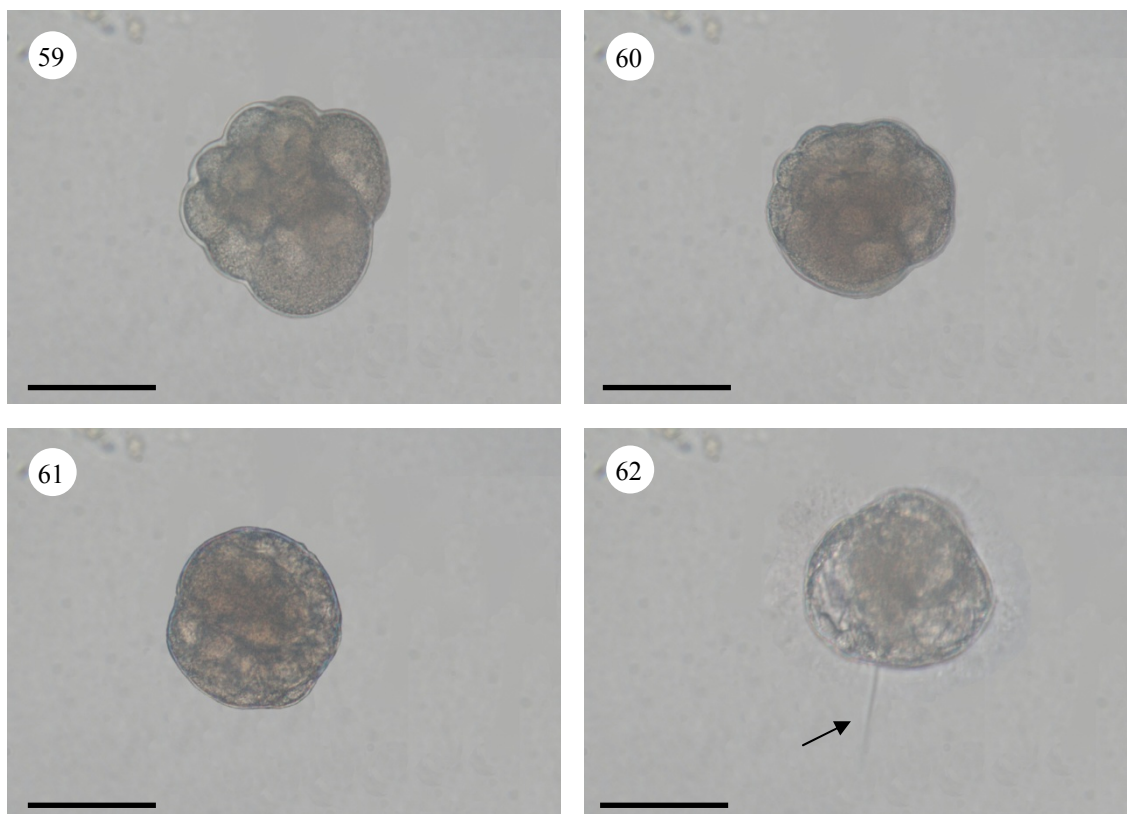


Fig. IV.59-62. Fotografías al microscopio óptico del desarrollo embrionario y larvario de *Ensis siliqua*. 59. Estadio de 16 células. 60. Estadio de 16 a 32 células. 61. Gástrula. 62. Trocófora; penacho apical (flecha). Barra de escala equivalente a 50 μm .

A las 12 hpf se obtiene una trocófora piriforme, que nada activamente en la columna de agua (Fig. IV.62 y IV.65). La trocófora posee un penacho apical de cilios agrupados (metatroca) que se observa como un largo flagelo a microscopía óptica. Con MEB se puede ver la corona prototroca y telotroca.

La glándula de la concha se puede ver en la trocófora tardía, estando ya muy desarrollada, vista desde la telotroca en las figuras IV.66 y IV.67. En la figura IV.68 se puede observar una larva de 16 hpf, en la que la prodisoconcha está comenzando a secretarse, a partir de la glándula de la concha. La prototroca va a dar lugar al velo con varias filas de cilios para la captura de alimento y la locomoción. La prodisoconcha I progresivamente va a recubrir las partes blandas de la larva, hasta dar lugar a una larva D veliger a las 24 hpf, con una longitud de $134,45 \pm 6,47 \mu\text{m}$ (Fig. IV.69 y IV.71).

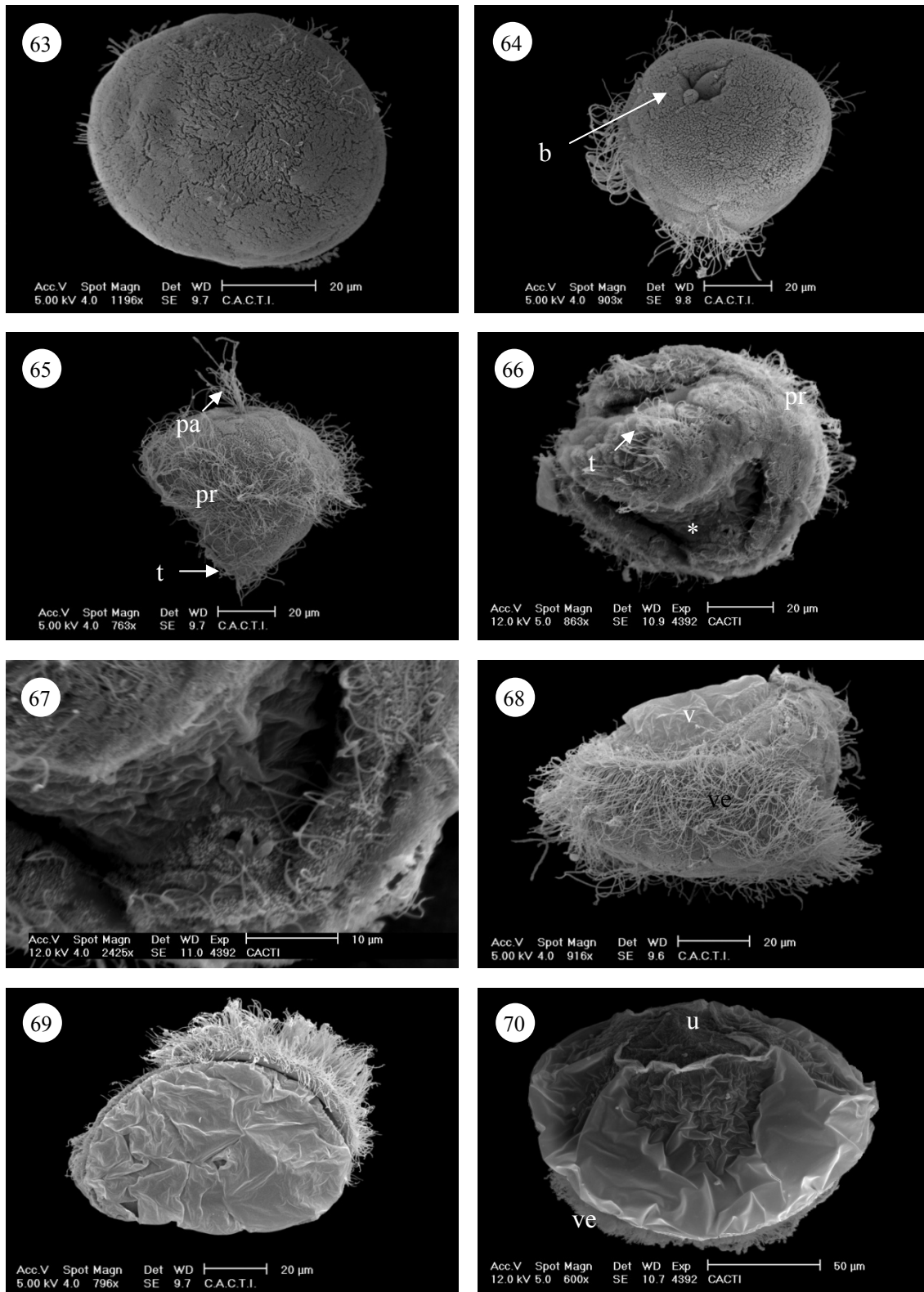


Fig. IV.63-70. Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo embrionario y larvario de *Ensis siliqua*. 63. Blástula. 64. Gástrula, mostrando el blastoporo (b). 65. Trocófora, con la corona telotroca (t), prototroca (pr) y el penacho apical (pa). 66. Trocófora tardía, vista desde la telotroca (t) en la que se observa la prototroca (pr) y glándula de la concha (*). 67. Detalle de la glándula de la concha en la trocófora tardía. 68. Transición de trocófora a larva D veliger, en la que se aprecia el velo (ve) y la formación de las valvas (v). 69. Larva D veliger. 70. Larva umbonada de 5 dpf; umbo (u).

En esta larva D se puede observar el aparato digestivo totalmente desarrollado, con boca, un corto esófago y un estómago que continúa en un intestino que evacua por el ano. Además, también se pueden observar los músculos retractores del velo. El aspecto de la prodisoconcha I es similar al de *E. arcuatus* debido al procesamiento en la preparación de muestras para MEB, como se explica en el apartado IV.3.1.

A los 5 días post-fertilización (dpf) las larvas veliger presentan umbo (Fig. IV.70 y IV.72). Las larvas umbonadas tienen una longitud de $211,7 \pm 10,1 \mu\text{m}$, y en ellas la glándula digestiva aparece fuertemente coloreada de marrón. Con $340,6 \pm 22,2 \mu\text{m}$ de longitud y aproximadamente 10 dpf se alcanza el estado de pediveliger (Fig. IV.73 y IV.75-79), en el que la larva aún conserva el velo como órgano de captación de alimento y para realizar breves desplazamientos, pero ya tiene pie, con el que principalmente reptará por el sustrato. La fijación tiene lugar a los 14 dpf, con una talla de $427,8 \pm 48,0 \mu\text{m}$, y en la postlarva ya se pueden observar los filamentos branquiales totalmente formados (Fig. IV.74 y IV.80-82).

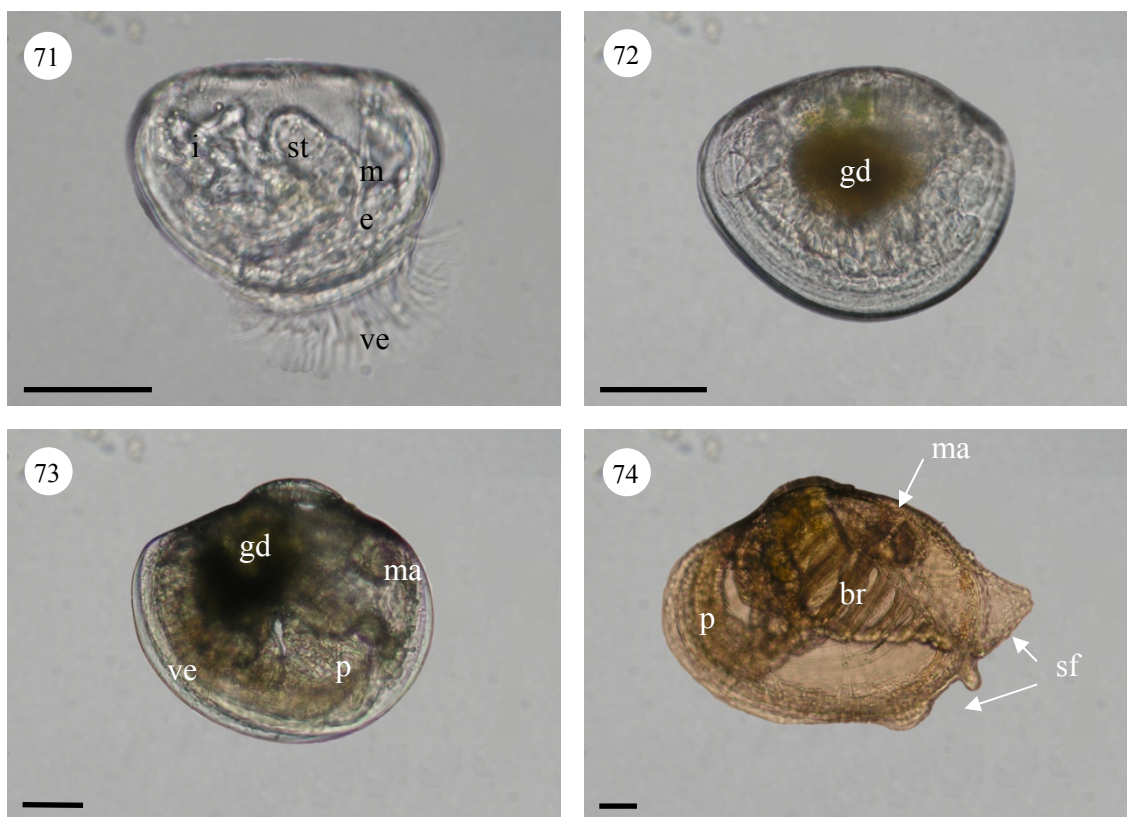


Fig. IV.71-74. Fotografías al microscopio óptico del desarrollo larvario de *Ensis siliqua*. 71. Larva D veliger; velo (ve); esófago (e); estómago (st); intestino (i); músculo retractor del velo (m). 72. Larva veliger umbonada de 5 dpf; glándula digestiva (gd). 73. Pediveliger de 10 dpf; músculo aductor (ma); pie (p). 74. Postlarva de 14 dpf; branquias (br); sifones (sf). Barra de escala equivalente a $50 \mu\text{m}$.

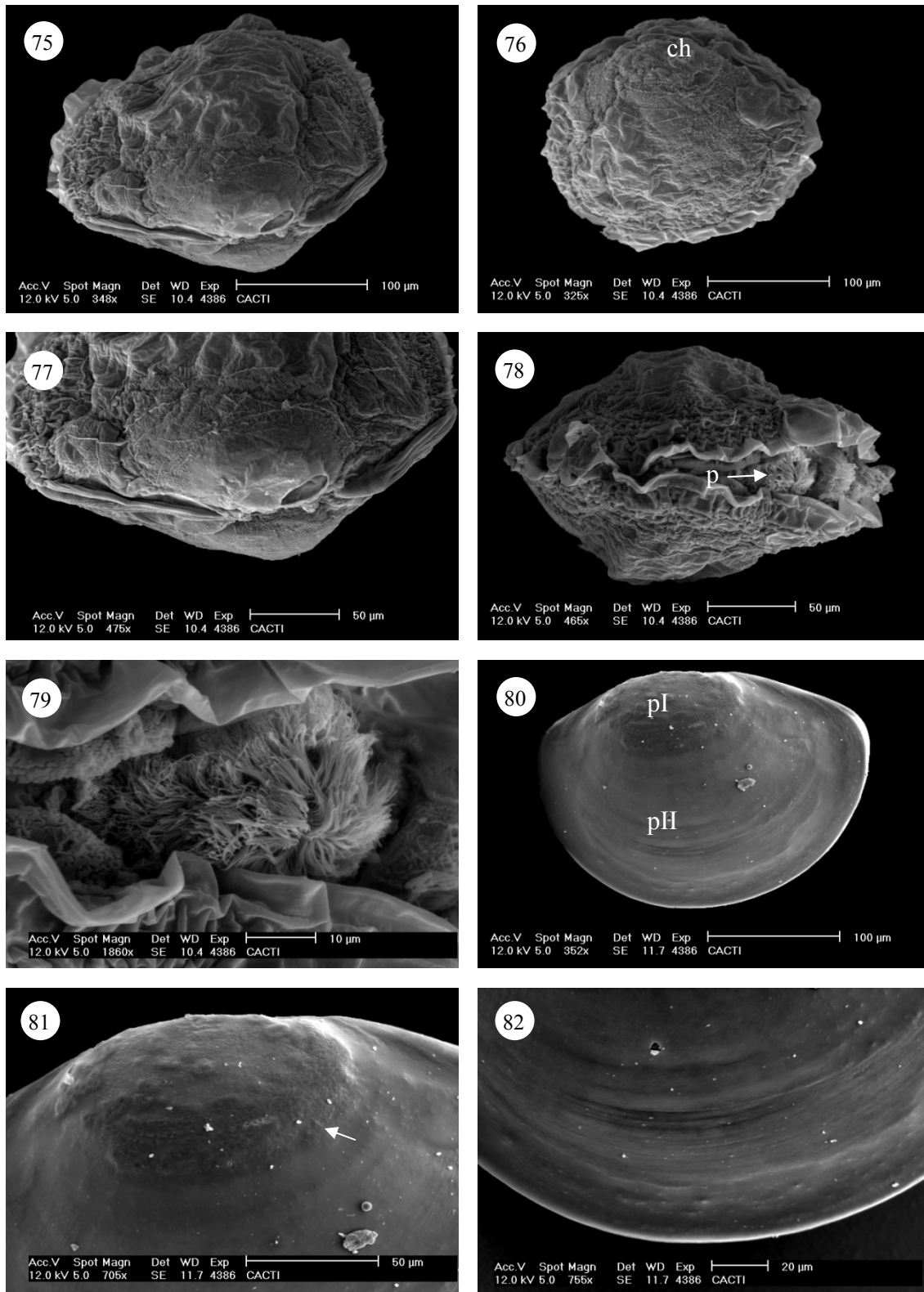


Fig. IV.75-82. Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo larvario de *Ensis siliqua*. 75. Pediveliger de 10 dpf. 76. Pediveliger de 10 dpf, vista de la charnela (ch). 77. Detalle de la charnela de pediveliger de 10 dpf. 78. Pediveliger de 10 dpf mostrando el pie (p), vista lateral. 79. Detalle del pie. 80. Postlarva de 14 dpf, mostrando la prodisoconcha I (pI) y la prodisoconcha II (pII). 81. Detalle de la prodisoconcha I, y la transición a la prodisoconcha II (flecha). 82. Detalle de la prodisoconcha II.

IV.3.3.- Longueirón vello (*Solen marginatus*)

Los tiempos en los que se producen los diferentes estadios embrionarios no se han podido estudiar, dada la imposibilidad de observar el desove en criadero de ejemplares adultos de *S. marginatus*. El desarrollo larvario sí que ha se podido estudiar, puesto que espontáneamente los adultos han desovado numerosas veces en criadero, y se pueden ver los tiempos a los que se suceden los estadios larvarios (Tabla IV.3). El desarrollo embrionario pudo ser seguido desde la fase de 4 células, obteniendo fotografías al microscopio óptico de todas las fases, pero sin poder estudiar el tiempo en que se produce cada división en el embrión. Debido a la imposibilidad de descapsular los ovocitos, no se pudo estudiar su embriología con MEB, logrando sólo microfotografías de la cápsula (Fig. IV.95).

Tabla IV.3. Estadios larvarios en *Solen marginatus*.

| Tiempo desde fertilización | Estadio |
|----------------------------|-------------------------|
| 12-24 h | Larva D |
| 3 días | Larva umbonada |
| 5-6 días | Pediveliger |
| 8-9 días | Metamorfosis y fijación |

A pesar de ello, el estudio de la morfología embrionaria al microscopio óptico ha podido ser posible al seguir una puesta a partir del estadio de 4 células. Los huevos de *Solen marginatus* presentan un diámetro de $156,2 \pm 14,6 \mu\text{m}$ y una envuelta coriónica translúcida de unos $30 \mu\text{m}$ de espesor (Fig. IV.83). El desarrollo embrionario continúa dentro de esta envuelta, pasando al estadio de 2 células, en las que hay 2 blastómeros desiguales (Fig. IV.84), y da lugar a un estadio de 4 células con 1 macrómero, sobre el que se disponen 3 micrómeros iguales (Fig. IV.85). En la figura IV.86 se puede ver cómo en el estadio de 8 células, los micrómeros siguen colocándose sobre un único macrómero. Al llegar al estadio de 16 células se observa cómo la envuelta coriónica está compuesta por una membrana exterior y en su interior hay una gota lipídica que comienza a reducir su tamaño visiblemente, separándose de la membrana exterior (Fig. IV.87). A medida que el número de células del embrión aumenta, la gota lipídica se va reduciendo (Fig. IV.88), hasta desaparecer por completo en la gástrula, quedando el embrión dentro de la membrana exterior (Fig. IV.89).

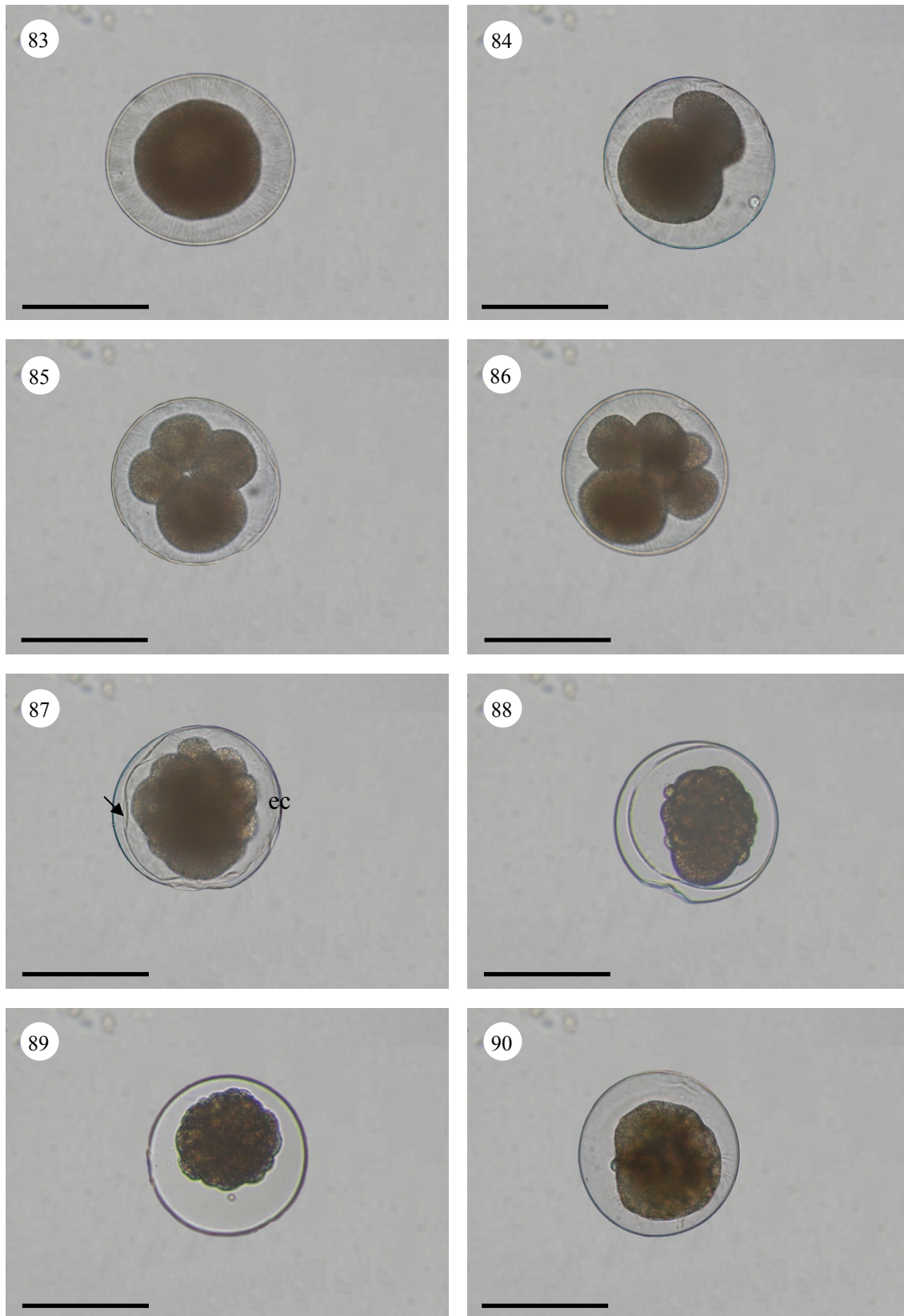


Fig. IV.83-90. Fotografías al microscopio óptico del desarrollo embrionario de *Solen marginatus*. 83. Ovocito. 84. Estadio de 2 células. 85. Estadio de 4 células. 86. Estadio de 8 células. 87. Estadio de 16 células; envuelta coriónica (ec); gota lipídica (flecha). 88. Estadio de 16 a 32 células. 89. Gástrula. 90. Trocófora. Barra de escala equivalente a 100 μ m.

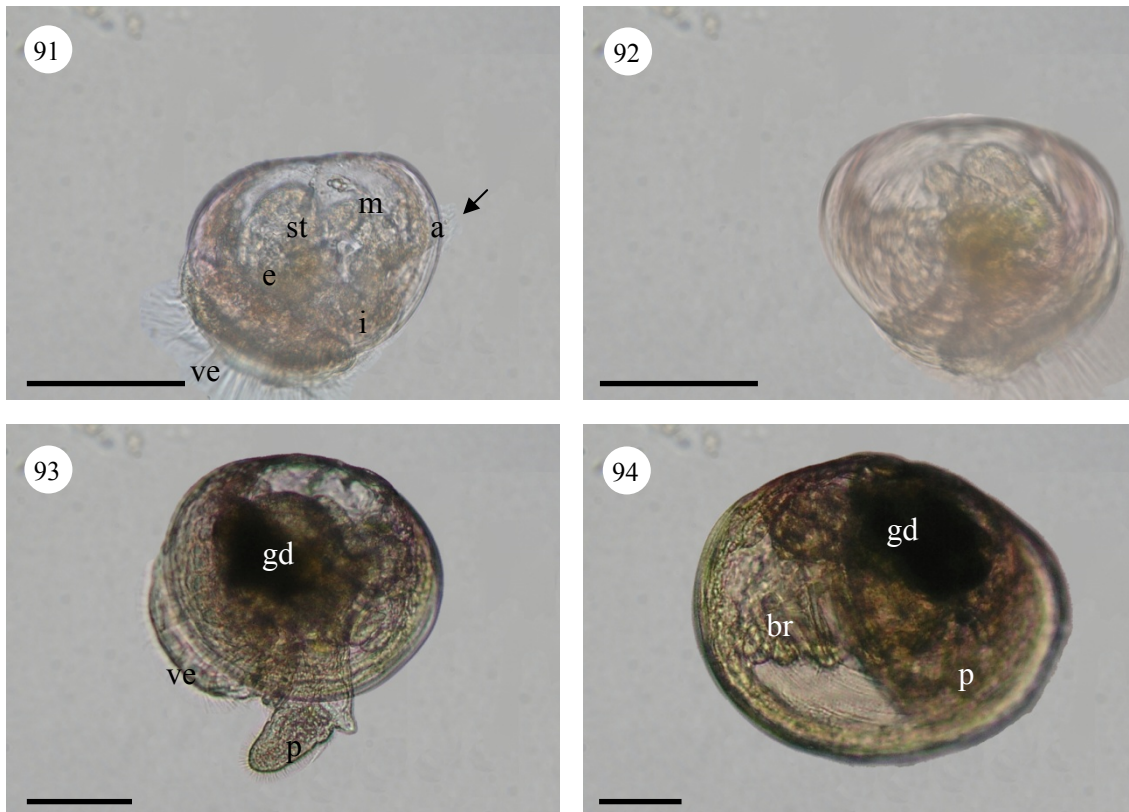


Fig. IV.91-94. Fotografías al microscopio óptico del desarrollo larvario de *Solen marginatus*. 91. Larva D veliger de 1 dpf; velo (ve); esófago (e); estómago (st); intestino (i); ano (a); músculo (m); mechón post-anal (flecha). 92. Larva umbonada de 3 dpf. 93. Pediveliger de 6 dpf; velo (ve); glándula digestiva (gd); pie (p). 94. Postlarva de 9 dpf; branquias (br). Barra de escala equivalente a 100 µm.

La trocófora continúa en el interior de esta envuelta, dentro de la cual presenta un movimiento giratorio debido al batido de los cilios, permitiéndole el desplazamiento en la columna de agua (Fig. IV.90).

La envuelta coriónica sigue presente hasta que la larva D veliger está completamente formada, momento en el que la larva sale de esta membrana. A microscopía óptica se puede ver cómo la larva D se desplaza con el velo y captura el alimento, además de un aparato digestivo completo, con su boca, esófago, estómago, intestino y ano, que está rodeado por un mechón post-anal (Fig. IV.91). Esta larva presenta una longitud de $167,4 \pm 9,3$ µm.

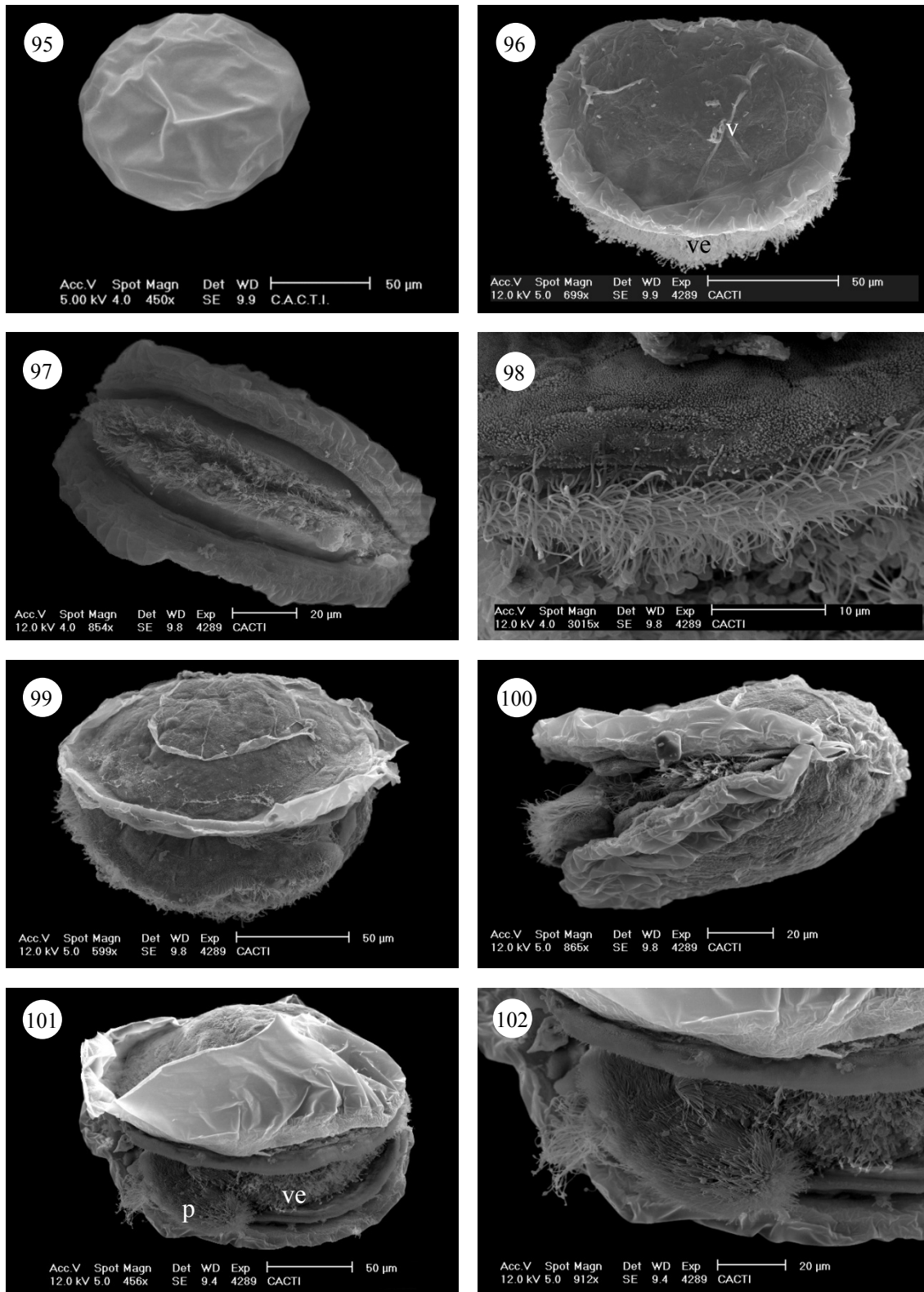


Fig. IV.95-102. Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo larvario de *Solen marginatus*. 95. Envuelta coriónica del ovocito. 96. Larva D veliger de 1 día post-fertilización (dpf) mostrando el velo (ve) y las valvas (v). 97. Larva D veliger de 1 día, mostrando las valvas abiertas. 98. Detalle del velo y el borde del manto. 99. Larva umbonada de 3 dpf. 100. Larva umbonada de 3 dpf, vista lateral. 101. Pediveliger de 6 dpf, mostrando el velo (ve) y el pie (p). 102. Detalle del pie de la pediveliger.

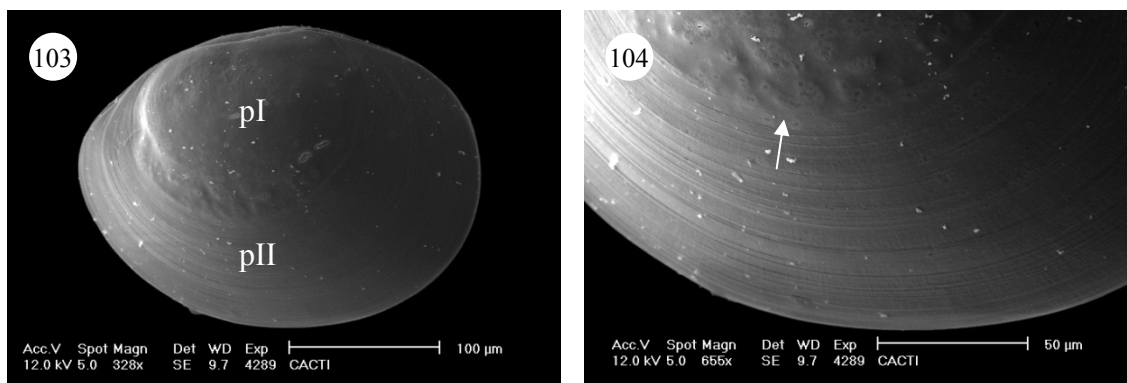


Fig. IV.103-104. Microfotografías al microscopio electrónico de barrido del desarrollo larvario de *Solen marginatus*. 103. Postlarva de 9 dpf. 104. Detalle de la prodisoconcha I (pI) y la transición a la prodisoconcha II (pII) en una postlarva de 8 dpf (flecha).

A MEB se puede ver que la prodisoconcha I presenta un aspecto de membrana similar al de las preparaciones de *E. arcuatus*, debido al procesado en la preparación de las muestras para MEB, como se explica en el apartado IV.3.1. El velo presenta varias filas de cilios, sin que se pueda precisar su número, y el reborde del manto presenta unas microvellosidades (Fig. IV.96-98).

En la larva veliger a los 3 dpf aparece el umbo, con una longitud de $204,2 \pm 6,7$ μm (Fig. IV.92 y IV.99-100). La glándula digestiva comienza a ser más evidente, en forma de mancha marrón, en el centro de la larva. Ésta, con el paso de los días irá adquiriendo más coloración, llegando a pediveliger a los 6 dpf, con una talla de $242,60 \pm 20,29$ μm (Fig. IV.93). En las microfotografías de MEB en la pediveliger se observa el velo y el pie ciliado con forma cilíndrica y un grupo de cilios de unos 20 μm en la base, en la parte más exterior (Fig. IV.101-102). A los 9 dpf las larvas sufren la metamorfosis dando lugar a postlarvas con $302,6 \pm 17,7$ μm de longitud, en las que a microscopía óptica se puede observar el pie y los filamentos branquiales (Fig. IV.94). En las figuras IV.103 y IV.104, se puede observar cómo las preparaciones ya han perdido esa película presente en las larvas veliger, con lo que se diferencian la prodisoconcha I, con su aspecto punteado, y la prodisoconcha II, con líneas concéntricas de crecimiento.

IV.4.- DISCUSIÓN

Éste es el primer estudio de embriología de solénidos con microscopía electrónica de barrido (MEB). Aunque existen estudios en otros bivalvos con MEB sobre embriología (Hodgson & Burke, 1988; Bellolio *et al.*, 1993; Gros *et al.*, 1997, 1999; Zardus & Morse, 1998; Mouëza *et al.*, 1999, 2006; Raleigh & Keegan, 2007) y diferentes aspectos larvarios como estructura del velo, morfología de la concha o biología larvaria (Hodgson & Burke, 1988; Cragg, 1989; Casse *et al.*, 1998; Mouëza *et al.*, 1999, 2006), éste aborda el estudio de las larvas de las 3 especies, describiendo la morfología desde la fecundación del ovocito hasta postlarva.

El tamaño de los ovocitos de *Ensis arcuatus* es similar al encontrado en otras especies de solénidos como en *E. directus* (Loosanoff & Davis, 1963; Loosanoff *et al.*, 1966). Por el contrario, en *E. siliqua* los ovocitos tienen un diámetro mayor, próximo a 100 μm . Sin embargo, *Solen marginatus* presenta una envuelta coriónica de aproximadamente 30 μm de espesor y un diámetro de 150 μm . Según Ockelmann (1965), los ovocitos de pequeño tamaño y con un vitelo limitado son típicos del desarrollo planctotrófico.

En *S. marginatus* la membrana coriónica debe ser fluida puesto que hay desplazamiento dentro de esta envuelta en la fase de trocófora y en la larva D-veliger temprana. Carriker (1967), consideraba la presencia de esta envuelta como una adaptación a las fluctuaciones ambientales existentes en los ambientes estuarinos. Según Frenkiel & Mouëza (1979) en su trabajo con *Scrobicularia plana*, la protección de los primeros estadios del desarrollo puede ser una adaptación ecológica. Así, la envuelta coriónica representa una protección contra la desecación, las variaciones de la presión osmótica, la contaminación bacteriana y choques mecánicos. Para la misma especie, Raleigh & Keegan (2007) postulan que la envuelta coriónica actuaría también como barrera ante las infecciones bacterianas, reduciendo la tasa de infección en los estadios tempranos del desarrollo. En *S. marginatus* podría ser una adaptación a la desecación y a las variaciones de presión osmótica, puesto que se distribuyen en ambientes estuarinos con gran variabilidad de las condiciones ambientales como son las zonas intermareales y con influencia de descarga de agua dulce de los ríos. Además, la gota lipídica proporcionaría abundantes reservas energéticas para el desarrollo larvario.

Después de la fecundación la membrana vitelina se separa de la membrana plasmática, se expande y se endurece, y se transforma en membrana de fecundación como en *Chlamys hastata*, eclosionando a las 21 hpf una gástrula (Hodgson & Burke, 1988). La envuelta de fertilización presente en *E. arcuatus* y *E. siliqua* hasta la gástrula, aparece también en algunas especies de la familia Veneridae, como en *Mercenaria mercenaria*, en donde desaparece entre los estadios de blástula y trocófora (Loosanoff & Davis, 1950). En *Venus striatula* ésta cubierta desaparece en la fase de trocófora, cuando ya nadan libremente (Ansell, 1961). Pero en otras especies se conserva a través de la fase de trocófora hasta los inicios de la larva D veliger, como en *Scrobicularia plana*, en la que se mantiene hasta los 2½ - 4 días post-fertilización (dpf) (Frenkiel & Mouëza, 1979) o 48-56 hpf (Raleigh & Keggan, 2007); en *Codakia orbicularis* (Alatalo *et al.*, 1984; Gros *et al.*, 1997); en *Argopecten purpuratus* (Bellolio *et al.*, 1993); o en el solénido *Solen marginatus*, en el que se produce la eclosión entre 12 y 24 hpf (presente trabajo).

El lóbulo polar presente en *E. arcuatus* y *E. siliqua* no es único entre los Lamellibranchia, puesto que muchos lo poseen (*Mytilus*, *Crassostrea* y *Ostrea*), aunque en *Spisula* no está presente (Verdonk & Van den Biggelaar, 1983). La formación del lóbulo polar parece ser crucial para un desarrollo normal (Verdonk & Van den Biggelaar, 1983). El tamaño del lóbulo polar no sigue una relación positiva con el tamaño del huevo, como en *Crassostrea*, que posee un lóbulo bastante grande en relación con el tamaño del huevo (Verdonk & Van den Biggelaar, 1983).

Una comparativa de los tiempos en los que ocurren diferentes fases del desarrollo embrionario en diferentes bivalvos se puede ver en la tabla IV.4. En ella se presentan datos comparativos de embriología entre las 2 especies de *Ensis*, pero no ha sido posible comparar con *Solen*. Los tiempos de desarrollo embrionario en *E. siliqua* son algo más rápidos que en *E. arcuatus*, puesto que el desarrollo larvario es más corto. *E. directus* parece tener un desarrollo más rápido que *E. arcuatus*, pero es probable que sea debido al efecto de la temperatura de cultivo, pero es más lento que en *E. siliqua*.

Tabla IV.4. Esquema aproximado del desarrollo embrionario y larvario temprano de algunos bivalvos.

| Especie | Familia | Temperatura | 1 ^{er} corpúsculo polar | 1 ^a división | 2 ^a división | Gástrula | Trocófora | Larva D-veliger | Referencia |
|---------------------------------|------------|-------------|----------------------------------|-------------------------|-------------------------|------------|------------|-----------------|----------------------------------|
| <i>Ensis arcuatus</i> | Solenidae | 19±1°C | 20 min | 60 min | 90 min | 16 h | 19 h | 30 h | Presente trabajo |
| <i>E. siliqua</i> | Solenidae | 19±1°C | 20 min | 60 min | 90 min | 6 h 30 min | 12 h | 24 h | Presente trabajo |
| <i>E. directus</i> | Solenidae | 27-30 °C | 15-20 min | 42-46 min | 58-65 min | 10 h | 11 h | 27 h | Costello & Henley (1971) |
| <i>Crassostrea gigas</i> | Ostreidae | 22 °C | 15-25 min | 60 min | 75-80 min | - | - | 17-19 h | Malakhov & Medvedeva (1985) |
| <i>C. virginica</i> | Ostreidae | 21 °C | 40-50 min | 75-90 min | 80-120 min | 8 h | 24 h | 52 h | Amemiya (1926) |
| <i>Mytilus edulis</i> | Mytilidae | 20 °C | 18-20 min | 70 min | 80 min | - | 20 h | 43 h | Field (1922) |
| <i>Placuna placenta</i> | Placunidae | 27 °C | 15 min | 30-40 min | 50-60 min | 4 h | 5 h 30 min | 18-20 h | Madrones-Ladja (1997) |
| <i>Pecten irradians</i> | Pectinidae | - | 33 min | 46 min | 67 min | 10 h | 12-14 h | 17-40 h | Belding (1910) |
| <i>Nodipecten nodosus</i> | Pectinidae | 27±1°C | 5-15 min | 30 min | - | 12 h | 18 h | 26 h | De la Roche <i>et al.</i> (2002) |
| <i>Mercenaria mercenaria</i> | Veneridae | 22 °C | - | 45 min | 90 min | 9 h | 12 h | 24-36 h | Loosanoff & Davis (1950) |
| <i>Anomalocardia brasiliana</i> | Veneridae | 25 °C | 10 min | 30 min | 60 min | 6 h | 9 h | 24 h | Mouëza <i>et al.</i> (1999) |
| <i>Chione cancellata</i> | Veneridae | 25 °C | 10 min | 30 min | - | 4 h | 9 h | 24 h | Mouëza <i>et al.</i> (2006) |
| <i>Scrobicularia plana</i> | Semelidae | 20-22°C | 40 min | 90-110 min | 140 min | 10-14 h | 18-20 h | 36-38 h | Raleigh & Keegan (2007) |
| <i>Spisula solidissima</i> | Mactridae | 21 °C | 29 min | 74 min | 99 min | 5-6 h | 9 h | 18-19 h | Allen (1953) |

La presencia de esteroblástula es típica en *Ensis*, así como en otros bivalvos como *Crassostrea*, *Mytilus*, *Ostrea*, *Pecten* y *Venus* (Verdonk & Van den Biggelaar, 1983). En este tipo de blástula, la gastrulación es por epibolia. Los micrómeros, representando el ectoblasto, crecen sobre grandes endómeros y el margen del blastoporo se forma por derivación del segundo y tercer cuadrante. El movimiento epibólico es seguido de invaginación de los endómeros en *Ensis*, *Crassostrea* y *Mytilus* (Verdonk & Van den Biggelaar, 1983). Según Galtsoff (1937) en su trabajo sobre el desarrollo de *Crassostrea virginica*, el blastoporo que se forma por invaginación del endodermo, se cierra en el estado de trocófora y la boca se forma encima a partir de células ectodérmicas.

Tradicionalmente, los autores que han trabajado en la diferenciación de la concha durante el desarrollo embrionario de bivalvos han seguido el proceso descrito por Stepanoff (Kniprath, 1980). En *Mytilus galloprovincialis* (Kniprath, 1980) y *Pecten maximus* (Casse *et al.*, 1998) la invaginación necesita cerrarse completamente antes de la formación de la concha, o parcialmente como sucede en *Spisula solidissima* (Eyster & Morse, 1984). Estos estudios en bivalvos se basan en el proceso descrito para gasterópodos (Kniprath, 1980). A pesar de todo ello, Mouëza *et al.* (2006) al estudiar *Chione cancellata* proponen una interpretación alternativa de la diferenciación de la concha, que aparece en el estadio de trocófora como un fenómeno independiente. Un estudio comparativo con análisis de microscopía electrónica de barrido y transmisión, muestra los movimientos morfogénicos localizando la glándula de la concha o "shell-field" en una posición dorsal bajo la futura prototroca, que desarrolla una banda de células ciliadas recubriendo la glándula de la concha. Ésta, que incluye células secretoras de la concha y de los ligamentos, nunca migra hacia el interior ni en ella tiene lugar una invaginación como tal. La banda de la prototroca y de la glándula de la concha constituye una hendidura abierta, al final de la cual ambas se encuentran en estrecho contacto. En nuestro estudio acerca del patrón de diferenciación de la concha en *E. arcuatus* y *E. siliqua* no puede determinarse, por lo tanto, en el futuro deberían hacerse preparaciones de microscopía electrónica de transmisión con un muestreo secuencial para confirmar qué interpretación es la adecuada para éstas especies.

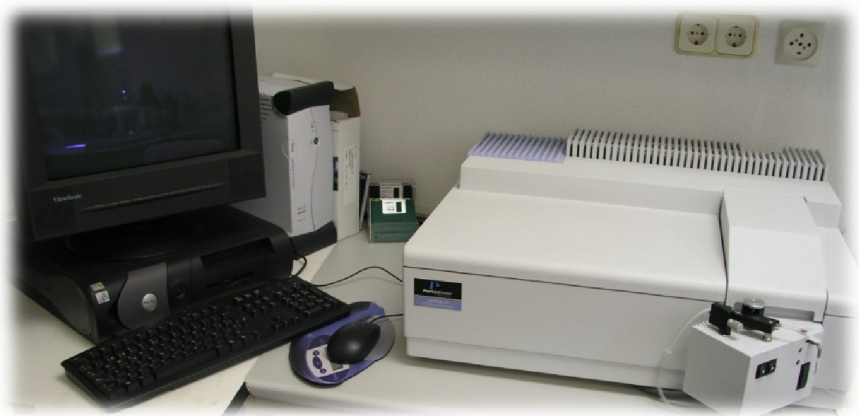
El penacho apical, consistente en unos cilios largos no móviles, está presente desde trocófora hasta el estadio de veliger, siendo una estructura común en numerosas

especies de bivalvos (Mouëza *et al.*, 1999). Se le ha considerado un órgano sensorial, pero su estructura era desconocida hasta hace poco. En *Ruditapes philippinarum* Tardy & Dongard (1993) describen una unidad central que podría ser un mecanorreceptor o quizás un quimiorreceptor y una estructura periférica, con una función sensorial desconocida. Sin embargo, la función como fotorreceptor no se ha considerado.

El tamaño de los espermatozoides de *E. siliqua* es similar a los presentes en *E. directus* (5,6 µm de largo y 2,8 µm de ancho de la cabeza), especie en la que los espermatozoides tienen una larga cola (Costello & Henley, 1971).

La confirmación de la estructura de la prodisoconcha I y II en las larvas veliger fue por “cryofocusing” a partir de larvas vivas, evitando que los reactivos químicos del procesamiento de las muestras para microscopía electrónica modifiquen el aspecto de las valvas. Así vemos que, desde el estadio de larva D veliger, la prodisoconcha está totalmente calcificada.

Los discocilios “paddle cilia” o “discocilia” se han descrito en variedad de invertebrados marinos, creyendo muchos investigadores que se trata de organelas genuinas (Short & Tamm, 1991). Se le han atribuido diferentes funciones, como por ejemplo microespátulas de material adhesivo o secreciones al sustrato, que sirven para incrementar la fuerza al batir los cilios y la efectividad de las corrientes de agua y alimento, incrementar la superficie de las membranas para capturar alimento, funcionar como quimiorreceptores y transporte de material desconocido a lo largo del cilio. Pero en diferentes trabajos se ha observado que son artefactos y se ha ido conociendo el mecanismo de formación (Deiner & Tamm, 1991; Short & Tamm, 1991; Deiner *et al.*, 1993), descubriéndose que el enrollamiento se debe a estrés por tensión de la membrana actuando sobre los axonemas elásticos (Deiner *et al.*, 1993).



V. Capítulo III: Bioquímica de las larvas

V.1.- INTRODUCCIÓN

El éxito en el cultivo en criadero de moluscos bivalvos depende de la disponibilidad de los nutrientes adecuados (Whyte *et al.*, 1987). Los constituyentes bioquímicos del alimento aportan los sillares para los procesos anabólicos de formación de tejidos y para la obtención de la energía que precisan los mismos.

Por eso, el conocimiento de la composición bioquímica de las microalgas suministradas como alimento, es esencial a la hora de establecer una dieta adecuada para las larvas y juveniles de los bivalvos. Los requerimientos nutricionales de las larvas de moluscos no son del todo conocidos. Así, algunos autores consideran el papel de carbohidratos y lípidos como esenciales (Enright *et al.*, 1986a), también los ácidos grasos poliinsaturados (Helm *et al.*, 1973; Langdon & Waldock, 1981), y otros autores como Webb & Chu (1982), puntualizan que la importancia de la alimentación suministrada depende más de otros nutrientes (ácidos grasos, aminoácidos, monosacáridos, minerales y vitaminas) que de la composición bioquímica general.

Además, se debe tener en cuenta que la composición bioquímica de las microalgas puede variar sustancialmente dependiendo de la especie, de las condiciones de cultivo y de la fase de crecimiento en que se encuentran al ser cosechadas (Whyte, 1987).

Se han probado numerosas especies microalgales que producen mejores rendimientos en crecimiento y supervivencia, unas más que otras (Davis & Guillard, 1958; Walne, 1970; Epifanio *et al.*, 1981). Helm (1977) demostró que, las larvas de *Ostrea edulis* alimentadas con dietas microalgales mixtas, crecían más que cuando las microalgas se utilizan por separado.

El éxito de los cultivos larvarios de bivalvos depende, en gran medida, de los niveles de energía almacenada que puede ser metabolizada para sostener los cambios que se producen durante la embriogénesis, metamorfosis o para mantenerse en períodos de ayuno.

El primero, que se corresponde con el desarrollo embrionario, está principalmente regido por las reservas endógenas de los ovocitos que provienen de los progenitores (Bayne, 1973). Estas reservas se utilizan desde la fecundación del ovocito hasta la formación de la primera larva veliger o larva D, en un período denominado endotrófico (Lucas *et al.*, 1986).

Además, puede existir una fase intermedia o mixotrófica, en la que las larvas siguen utilizando las reservas procedentes del ovocito y alimentándose externamente al mismo tiempo. Después de la primera alimentación, y durante unos 4 días, no hay almacenamiento de reservas lipídicas en las larvas, puesto que se está produciendo el paso nutricional de endotrofia a exotrofia. Se ha observado que las tasas de triglicéridos de partida no se correlacionan con la calidad del desarrollo posterior de las larvas de vieira *Pecten maximus* (Delaunay, 1992). Así, si la transición nutricional se hace de forma incorrecta, las larvas consumen rápidamente sus reservas sin renovarlas, lo que llevaría a un agotamiento de las reservas energéticas en la larva. Inversamente, larvas que posean pocas reservas lipídicas, pueden desarrollarse correctamente si el paso de endotrofia a exotrofia se hace de un modo adecuado.

La dificultad para superar ese cambio nutricional puede tener un origen endógeno en las larvas, heredado de los adultos o exógeno, ligado a unos parámetros de cultivo inadecuados como la composición bioquímica de las microalgas, proliferación bacteriana o materia particulada en el medio.

La metamorfosis, transición de larvas a juveniles, es la segunda etapa del desarrollo que recae sobre reservas almacenadas, ya que es una fase en la que sucede la desintegración del velo, que limita la locomoción e inhibe la alimentación (Hodgson & Burke, 1988). Las reservas de energía en la larva premetamórfica dependen del valor nutricional de las dietas microalgales de la larva en desarrollo (Whyte *et al.*, 1989, 1990a,b). La utilización de reservas endógenas durante la metamorfosis refleja la incapacidad de los bivalvos para capturar partículas del alimento entre 2 y 8 días mientras se reemplaza el órgano de captura de alimento de las larvas (el velo) por el de los juveniles y adultos (las branquias).

Otro proceso que ocurre durante la metamorfosis es la transición de la concha larvaria, prodisoconcha II, a la concha de los adultos (Waller, 1981). La concha se compone de cristales de carbonato cálcico unidos a una matriz orgánica que consiste principalmente en proteínas (Wilbur & Saleuddin, 1983). El crecimiento de la concha es continuo, pero la tasa de crecimiento varía dependiendo del estadio de desarrollo de los bivalvos (Whyte *et al.*, 1992).

La viabilidad de las larvas debe estar limitada por la acumulación y/o utilización de sustratos energéticos, como lípidos (Millard & Scott, 1967; Helm *et al.*, 1973; Holland & Spencer, 1973) o proteínas (Barlett, 1979; Rodríguez *et al.*, 1990), pero no carbohidratos (Collyer, 1957; Holland & Spencer, 1973; Barlett, 1979; Gallagher & Mann, 1986; Gallagher *et al.*, 1986). Pero a pesar de ello, Haws *et al.* (1993) mantienen que los carbohidratos deben jugar un papel en la óptima utilización de otras reservas.

La hipótesis implicada en todos estos estudios es que, la viabilidad de las larvas de bivalvos, está determinada por la capacidad de las larvas de acumular suficientes reservas para permitir mantener la demanda energética durante el proceso del desarrollo. Cuando el animal lleva a cabo el proceso de la metamorfosis, va a estar particularmente afectado por un déficit energético, que pone en peligro su habilidad para sobrevivir. Así, la supervivencia debe depender de la habilidad para completar nuevas estructuras, incluida la formación de la concha, a expensas de las reservas acumuladas antes de la metamorfosis.

De acuerdo con Haws *et al.* (1993), el éxito de la metamorfosis no sólo se debe a la acumulación de suficientes reservas de un único sustrato para cubrir las necesidades energéticas de la metamorfosis. De hecho, la supervivencia debe depender de la habilidad para movilizar varios tipos de sustratos para varios procesos anabólicos y catabólicos del organismo.

Como numerosos autores han puesto de manifiesto, el crecimiento de la concha y la composición bioquímica de las larvas son un buen indicador de las condiciones del ambiente, tanto en el medio natural como en el laboratorio. Cambios en la composición bioquímica reflejan modificaciones en la calidad del ambiente (Gabbott & Holland, 1973; Mann & Gallagher, 1985; Gallagher *et al.*, 1986; Ferreiro *et al.*, 1990). El estudio de

la composición bioquímica de las larvas es una herramienta importante para evaluar el metabolismo energético y la condición nutricional de los bivalvos procedentes de criadero.

Por todo lo expuesto, el objetivo de este capítulo es el estudio de los distintos componentes bioquímicos y su adecuado equilibrio a lo largo del desarrollo larvario en las tres especies de solénidos, así como permitir la comparación entre estas especies para intentar encontrar una explicación desde el punto de vista bioquímico, a la distinta duración del período larvario.

V.2.- MATERIAL Y MÉTODOS

V.2.1.- Recogida de muestras

Las muestras de los distintos estadios estudiados en las tres especies se han recogido según lo especificado en el apartado III.2.5.1., utilizándose las muestras empleadas para la determinación de los pesos secos a lo largo del desarrollo larvario. Se recogieron como se describe a continuación: en total se han seguido 3 desarrollos por duplicado de *Ensis arcuatus* y *E. siliqua* y 2 desarrollos por duplicado de *Solen marginatus*.

Las muestras de los diferentes estadios embrionarios y larvarios se observaron *in vivo* al microscopio óptico. Se recogieron del total de larvas que se dispusieron en un vaso de precipitado de volumen conocido. Se homogenizaron, se tomaron 10 alícuotas para depositarse en portaobjetos escavados y proceder al conteo de las mismas bajo lupa. A partir de estas alícuotas se calculó el número total de larvas presentes en el cultivo. Para el seguimiento del crecimiento se midieron la longitud y altura de 50 larvas elegidas aleatoriamente con una lupa acoplada a un analizador de imagen (PC Image).

Para el estudio del peso seco en las distintas fases se recogieron 6 muestras en cada fase por puesta, cuyo número de individuos por muestra era conocido. Se lavaron con formiato amónico (3%) para eliminar las sales y se congelaron para su posterior liofilización. Las muestras liofilizadas se mantuvieron en desecador durante 1 hora para luego pesarlas en balanza de precisión Sartorius MC 210S (D.E.=0,01 mg). A continuación, se les restó la tara para hallar el peso seco.

A lo largo del cultivo se recogieron muestras en distintos días (Tabla V.1) según las especies, de modo que se tuviesen muestras de fases significativas de todo el desarrollo.

Se han analizado al azar muestras por duplicado de la mezcla de fitoplancton utilizada como alimento en 6 cultivos, consistente en las siguientes especies: *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* y *Chaetoceros calcitrans*. Una vez conocida la concentración de la mezcla de microalgas, un volumen entre 5 y 15 ml

se filtró en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F de 4,5 cm de diámetro, previamente horneados a 450°C durante 24 horas. Se lavaron las sales con formiato amonio al 3% y se almacenaron a -20°C, previo burbujeo con nitrógeno.

Tabla V.1. Días de recogida de muestra para cada especie (coloreado de amarillo) y fase del desarrollo larvario con la que corresponde.

| Días | <i>Ensis arcuatus</i> | <i>Ensis siliqua</i> | <i>Solen marginatus</i> |
|------|-----------------------|----------------------|-------------------------|
| 0 | Ovocito | Ovocito | Ovocito |
| 1 | Larva D veliger | Larva D veliger | Larva D veliger |
| 5 | | | Pediveliger |
| 8 | | Pediveliger | Postlarva |
| 15 | Pediveliger | Postlarva | |
| 20 | Postlarva | | |

V.2.2.- Métodos analíticos

V.2.2.1.- Determinación y extracción de lípidos totales

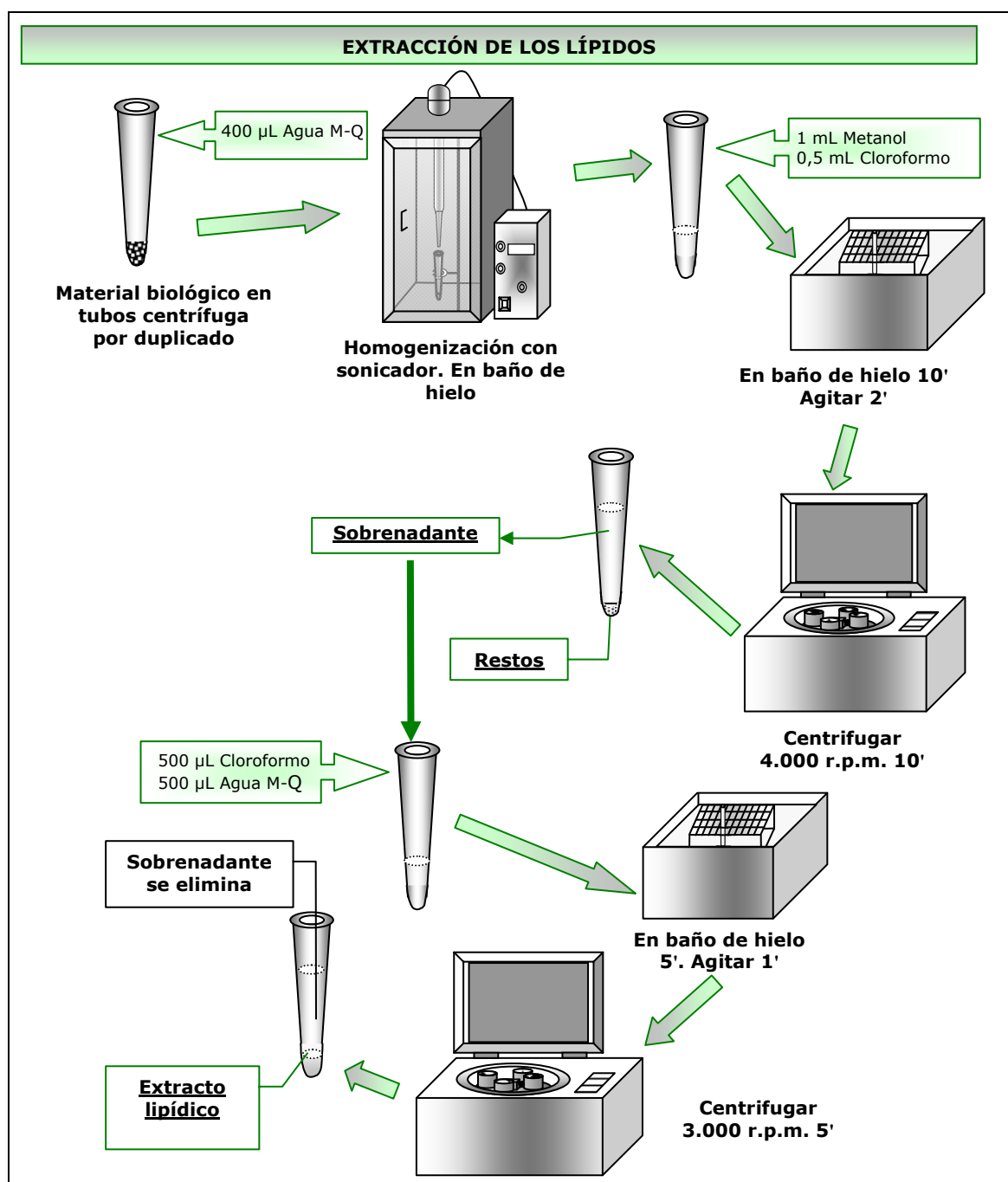
Los lípidos totales se hallan por el método de Marsh & Weinstein (1966), utilizando como estándar la tripalmitina (Sigma[®], T-5888) en un rango de concentraciones de 5-50 µg µl⁻¹ para hacer la recta de calibración. La absorbancia se mide a 375 nm en espectrofotómetro (Perkin Elmer UV/VIS Lambda 25). Es un método basado en el color obtenido en la reacción provocada al ser quemada la materia orgánica por el ácido sulfúrico cuando se incuban a 200°C. Existe una proporcionalidad entre el color producido en la reacción y el contenido en lípidos del extracto lipídico previamente obtenido.

Los reactivos utilizados son: cloroformo (Cl₃CH) para análisis, Merck[®]; metanol (MeOH) químicamente puro, Panreac[®]; ácido sulfúrico (SO₄H₂) 96%, Panreac[®].

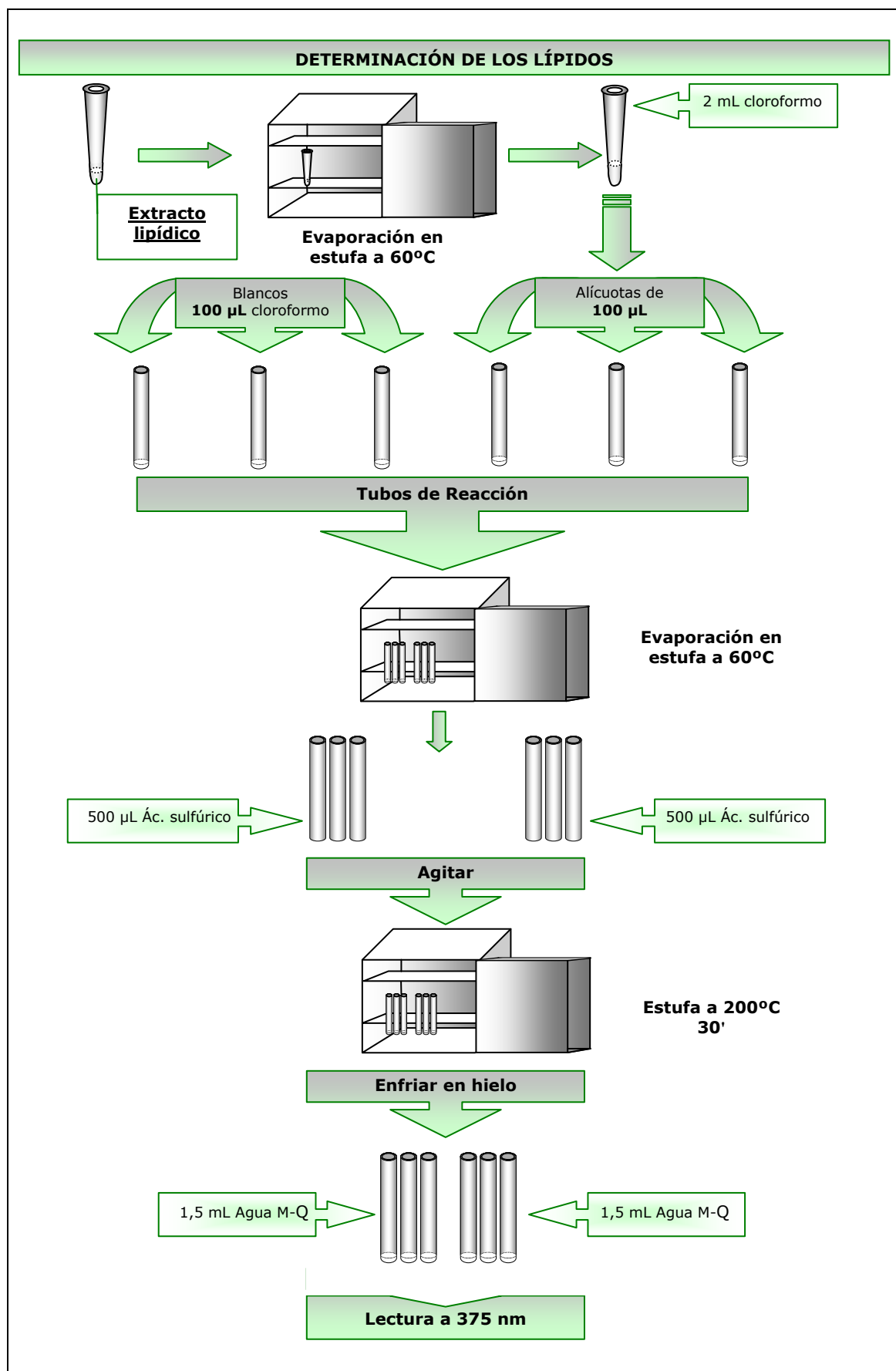
Se parte de una muestra de 1-2 mg, a la cual se añade 400 µl de agua Milli-Q y se sonica durante 30 segundos (Esquema V.1). Posteriormente, se añade 1 ml de metanol y 500 µl de cloroformo y se deja durante 10 minutos en baño de hielo para, a continuación, agitar 2 minutos cada tubo. Se centrifuga a 4000 r.p.m. durante 10 minutos (Centrífuga Heraeus Sepatech Varifuge 3.0 R) y se recoge el sobrenadante en otro tubo. A cada uno se le añaden 500 µl de cloroformo y 500 µl de agua Milli-Q, manteniéndolos en baño de hielo durante 5 minutos y a continuación, se agitan los

tubos. Tras centrifugar a 3000 r.p.m. durante 5 minutos, el sobrenadante se elimina con una pipeta Pasteur y la parte inferior se evapora a 60°C, para redisolverla en 2 ml de cloroformo (Esquema V.2). Se toman 3 alícuotas de 100 µl en tubos de reacción y se evaporan a 60°C. Se añade 500 µl de ácido sulfúrico a los tubos de reacción y se preparan 3 blancos de ácido sulfúrico. Los tubos se agitan y se mantienen a 200°C durante 30 minutos para luego enfriarlos en hielo, añadir 1,5 ml de agua Milli-Q y leer la absorbancia a 375 nm en espectrofotómetro.

Esquema V.1. Extracción de lípidos totales.



Esquema V.2. Determinación de lípidos totales.



V.2.2.2.- Determinación de proteínas

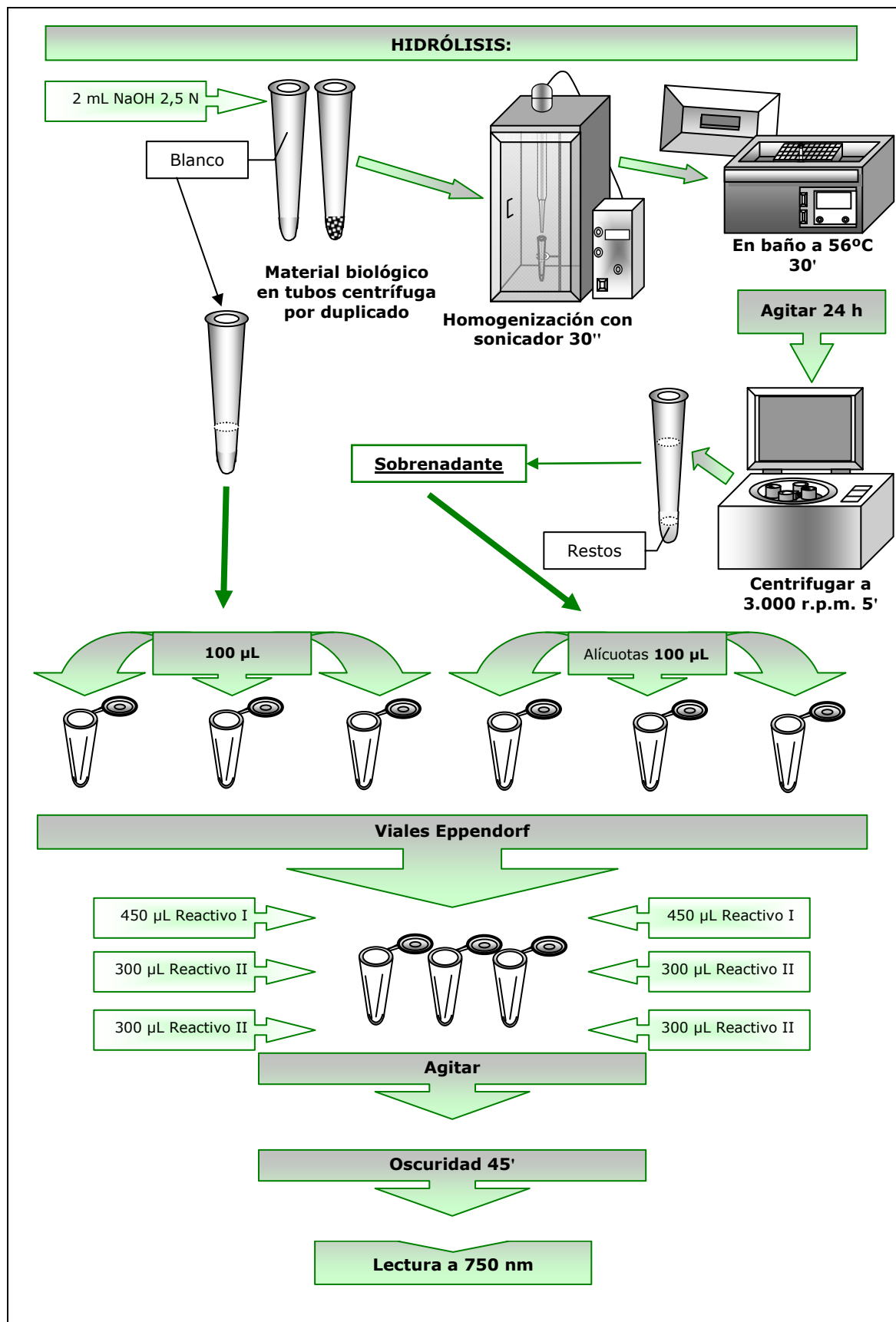
Se realiza a partir del método modificado de Lowry (Lowry *et al.*, 1951), basado en los resultados de Bensadoun & Weinstein (1976) y Hess *et al.* (1978). La recta de calibración se realiza utilizando como estándar la seroalbúmina bovina (Sigma[®], A-4503), con rango de concentraciones de 5 a 30 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$. La lectura de la absorbancia en el espectrofotómetro se realiza a una longitud de onda de 750 nm (Esquema V.3).

Este método combina la formación de complejos entre los iones Cu^{+2} en medio alcalino y los enlaces peptídicos de proteínas, con la reducción del reactivo comercial Folin-Ciocalteu por los grupos fenólicos de las cadenas laterales de la tirosina y el triptófano. El color producido por los reactivos va a ser proporcional al contenido en proteínas de la muestra.

Los reactivos utilizados son: hidróxido sódico, Merck[®]; tartrato disódico, Merck[®]; sulfato de cobre II hidratado, Merck[®]; ácido fosfo-molibdeno-ácido fosfotúngstico (Folin-Ciocalteu), Merck[®].

Se parte de una muestra por duplicado de entre 1 y 2 mg, a la cual le añadimos 2 ml de hidróxido sódico (2,5 N) en un sonicador (Sonicador Branson Sonifier 450) y se mantiene en un baño a 56°C durante 30 minutos para favorecer la hidrólisis del tejido. Posteriormente, mantenemos las muestras durante 24 horas en un agitador, centrifugándolas después para decantar los restos de tejido. Del sobrenadante se recoge una alícuota por triplicado de 100 μl , a la cual añadimos 450 μl de reactivo I y 600 μl de reactivo II. Los tubos se agitan vigorosamente y se dejan incubar durante 45 minutos en oscuridad, para luego leer la absorbancia en un espectrofotómetro a 750 nm.

Esquema V.3. Determinación de proteínas.



Para llevar a cabo este método se preparan las siguientes mezclas:

-Reactivo I preparado extemporáneamente:

| | |
|--------------------------------|--|
| ➤ 25 volúmenes de NaOH 0,8 M | |
| | ➤ 0,2 g de tartrato disódico |
| ➤ 18 volúmenes del reactivo A: | ➤ 10 g de carbonato sódico |
| | ➤ 69 ml de NaOH 0,8 M enrasados a 100 ml de agua Milli-Q |
| | ➤ 2 g de tartrato disódico |
| ➤ 2 volúmenes del reactivo B: | ➤ 1 g de sulfato de cobre (II) |
| | ➤ 12,5 ml de NaOH 0,8 M enrasados a 100 ml de agua Milli-Q |

-Reactivo II preparado de forma extemporánea:

| |
|--|
| ➤ 1 volumen reactivo comercial Folin-Ciocalteu |
| ➤ 2 volúmenes agua Milli-Q |

V.2.2.3.- Determinación de glúcidos totales

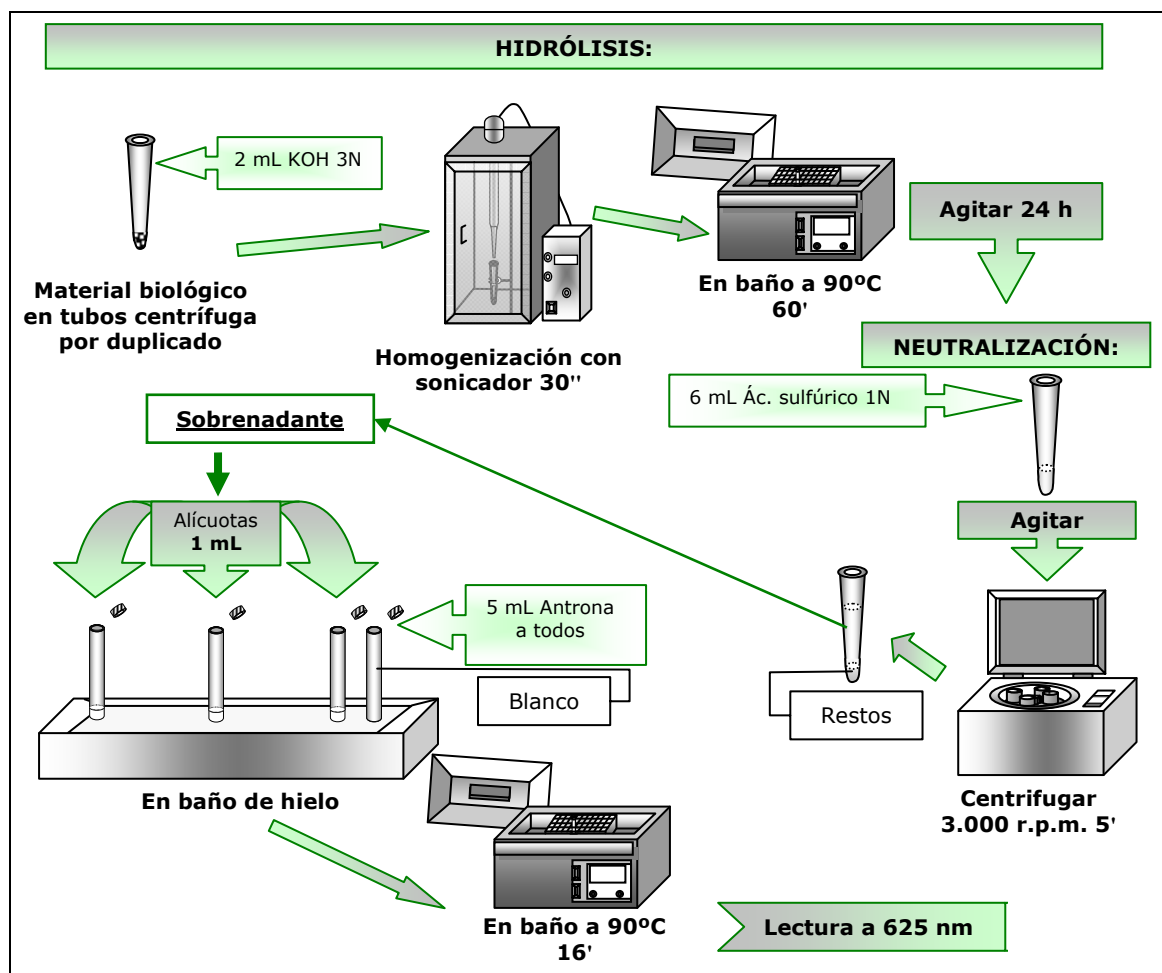
Para determinar la glucosa total se utiliza el método de la Antrona (Fraga, 1956). Es un método colorimétrico basado en una reacción específica para los carbohidratos, la reacción de Dreywood. Este método da buenos resultados cuando se aplica a moluscos marinos.

Los reactivos utilizados son: ácido sulfúrico 96% para análisis, Panreac[®]; antrona para análisis, Merck[®]; hidróxido de potasio en pastillas, Merck[®]; ácido benzoico para análisis, Merck[®].

A partir de 2-3 mg por duplicado de tejido liofilizado se cuantifica la glucosa total, siendo el estándar utilizado: D(+) glucosa anhidra (Merck[®]), en un rango de

concentraciones de $15\text{-}105\ \mu\text{g}\ \mu\text{l}^{-1}$, para obtener la recta de calibración. A las muestras se les añade 2 ml de hidróxido potásico, se sonica durante 30 segundos y se mantienen en baño a 90°C durante una hora, para realizar una hidrólisis (Esquema V.4). A continuación, se mantienen en agitación durante 24 horas. El siguiente paso es la neutralización con 6 ml de ácido sulfúrico 1 N, agitación y centrifugado a 3000 r.p.m. durante 5 minutos. Del sobrenadante se toman 3 alícuotas de 1 ml, se someten a un baño de hielo en el que se añade a cada tubo 5 ml del reactivo de antrona, preparando 3 blancos sólo de antrona. Las muestras se agitan y se colocan en un baño a 90°C durante 16 minutos. Se enfrían y leen a 625 nm en espectrofotómetro.

Esquema V.4. Determinación de los glúcidos totales.



V.2.3.- Equivalentes energéticos

En los intercambios de materia entre los animales y el ambiente, sólo la materia orgánica se tiene en cuenta. Para conocer el valor energético de una sustancia orgánica

se usan los equivalentes energéticos. El contenido calórico puede variar en función del estadio del ciclo vital, sexo, edad, época del año y la alimentación. Los factores de conversión energética utilizados para proteínas, lípidos y glúcidos fueron: 4,3; 8,42 y 4,1 kcal g⁻¹, respectivamente (Beukema & De Bruin, 1979).

V.2.4.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realiza utilizando el paquete estadístico SPSS® para Windows versión 13.0. En todas las comparaciones de medias de los distintos componentes bioquímicos en un mismo estadio entre especies se intentó agrupar los datos en los siguientes grupos: ovocito, larva D, pediveliger y postlarva.

La comparación de medias de los distintos componentes bioquímicos en los desarrollos larvarios se realizó con tests no paramétricos debido: al tamaño muestral, al incumplimiento por parte de algunos grupos de datos de la distribución normal y que no presentaban homogeneidad de varianzas. Para el contraste de más de dos muestras se aplicó el test H de Kruskal-Wallis y para el contraste dos a dos se aplicó el test de contraste de dos muestras independientes U de Mann-Whitney.

Para la comparación de los porcentajes de lípidos, proteínas y glúcidos totales entre estadios y entre especies, los valores se transformaron con una función arcoseno, para evitar trabajar con porcentajes (Sokal & Rohlf, 1995). Una vez transformados los datos, las medias se compararon mediante el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

En el estudio de asociación entre la composición bioquímica y el tamaño, peso seco de ovocitos y larvas D veliger y la supervivencia se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman (Zar, 1996).

Se utilizan los siguientes símbolos según el nivel de significación:

| | |
|--------------------------|---|
| n.s. = $p > 0,050$ | diferencias no significativas |
| * = $0,010 < p < 0,050$ | diferencias significativas al nivel del 95% |
| ** = $0,001 < p < 0,010$ | diferencias altamente significativas al nivel del 99% |

V.3.- RESULTADOS

V.3.1.- Composición bioquímica del alimento

La composición de la dieta suministrada a las larvas de las tres especies fue: *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis suecica*. Principalmente estaba compuesta por proteínas (24%), siendo los lípidos un componente bioquímico con un porcentaje muy próximo al de proteínas y los carbohidratos los que estaban presentes en menor cantidad (Tabla V.2).

Tabla V.2. Composición bioquímica expresada en porcentaje (%) de la dieta suministrada a las larvas y compuesta por: *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis suecica*.

| | Proteínas | Lípidos | Carbohidratos |
|-------|-----------|---------|---------------|
| Dieta | 23,5 | 21,3 | 3,6 |

V.3.2.- Composición bioquímica de las larvas de navaja (*Ensis arcuatus*)

El componente mayoritario en los ovocitos y larvas de *Ensis arcuatus* son las proteínas, seguido por los lípidos y en último lugar los glúcidos, presentes en una pequeña cantidad (Tabla V.3). El contenido de proteínas de ovocito (día 0) a larva D (día 1) desciende significativamente ($p=0,004$), mientras los lípidos se duplican (Fig. V.1.A). Los glúcidos no presentan diferencias significativas entre estos dos estadios ($p>0,05$). Los lípidos, a lo largo del desarrollo larvario, van aumentando desde el día 1 ($0,021 \mu\text{g ind.}^{-1}$) hasta alcanzar en la fijación $0,282 \mu\text{g ind.}^{-1}$ (día 20), presentando diferencias significativas al 95% de confianza entre todos los estadios larvarios. Las proteínas en los distintos estadios larvarios aumentan a partir del día 1 ($0,027 \mu\text{g ind.}^{-1}$) hasta la postlarva ($0,901 \mu\text{g ind.}^{-1}$), con diferencias significativas entre cada estadio y el anterior. Los glúcidos también presentan aumentos significativos ($p<0,05$) a partir del estadio de larva D (día 1).

Tabla V.3. Composición bioquímica en ovocitos y larvas de *E. arcuatus* en los tres desarrollos larvarios seguidos y el desarrollo medio. Valores expresados en $\mu\text{g individuo}^{-1}$, como valores medios \pm desviación estándar por puesta ($n=2$) y desarrollo medio ($n=6$). En la puesta media las letras distintas indican diferencias significativas al 95% de confianza entre estadios (test U de Mann-Whitney).

| Puesta | Día | Lípidos | Proteínas | Glúcidos |
|--------|-----|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| P-1 | 0 | 0,0098 \pm 0,0002 | 0,0367 \pm 0,0035 | 0,0015 \pm 0,0000 |
| | 1 | 0,0231 \pm 0,0004 | 0,0251 \pm 0,0033 | 0,0029 \pm 0,0000 |
| | 8 | 0,0239 \pm 0,0008 | 0,0778 \pm 0,0110 | 0,0034 \pm 0,0004 |
| | 15 | 0,1017 \pm 0,0254 | 0,2904 \pm 0,0039 | 0,0166 \pm 0,0015 |
| | 20 | 0,1537 \pm 0,0047 | 0,5059 \pm 0,0252 | 0,0329 \pm 0,0024 |
| P-2 | 0 | 0,0098 \pm 0,0003 | 0,0396 \pm 0,0040 | 0,0012 \pm 0,0001 |
| | 1 | 0,0186 \pm 0,0001 | 0,0224 \pm 0,0005 | 0,0017 \pm 0,0006 |
| | 8 | 0,0321 \pm 0,0002 | 0,0819 \pm 0,0038 | 0,0052 \pm 0,0009 |
| | 15 | 0,2126 \pm 0,0202 | 0,5175 \pm 0,0041 | 0,0427 \pm 0,0038 |
| | 20 | 0,3100 \pm 0,0138 | 0,8876 \pm 0,0000 | 0,1109 \pm 0,0518 |
| P-3 | 0 | 0,0139 \pm 0,0001 | 0,0559 \pm 0,0003 | 0,0025 \pm 0,0002 |
| | 1 | 0,0226 \pm 0,0007 | 0,0322 \pm 0,0013 | 0,0038 \pm 0,0014 |
| | 8 | 0,0302 \pm 0,0008 | 0,1134 \pm 0,0236 | 0,0031 \pm 0,0003 |
| | 15 | 0,1368 \pm 0,0033 | 0,4641 \pm 0,0430 | 0,0255 \pm 0,0057 |
| | 20 | 0,3816 \pm 0,0131 | 1,3094 \pm 0,0019 | 0,0918 \pm 0,0137 |
| Media | 0 | 0,0112 \pm 0,0021 ^a | 0,0441 \pm 0,0097 ^a | 0,0017 \pm 0,0006 ^a |
| | 1 | 0,0214 \pm 0,0023 ^b | 0,0266 \pm 0,0048 ^b | 0,0028 \pm 0,0011 ^a |
| | 8 | 0,0288 \pm 0,0039 ^c | 0,0911 \pm 0,0210 ^c | 0,0039 \pm 0,0011 ^b |
| | 15 | 0,1504 \pm 0,0527 ^d | 0,4241 \pm 0,1079 ^d | 0,0283 \pm 0,0123 ^c |
| | 20 | 0,2818 \pm 0,1046 ^e | 0,9010 \pm 0,3596 ^e | 0,0785 \pm 0,0373 ^d |

La composición bioquímica expresada en porcentaje es la que se puede ver en la figura V.1.B. El componente principal son las proteínas, con un porcentaje inicial en los ovocitos del 33,17%, que cae bruscamente a 9,38% en la larva D, con diferencias significativas ($p<0,05$) (Tabla V.4). El porcentaje se mantiene hasta el día 8, para aumentar hasta llegar a 16,4% en la pediveliger (día 15), con diferencias significativas, y aumentar ligeramente hasta la postlarva (18,7%). Los lípidos, desde el ovocito hasta la larva D, se mantienen con porcentajes del 7,9% y descienden hasta el 2,98% en el día 8, presentando diferencias con la larva D ($p<0,05$). El porcentaje aumenta en la pediveliger (día 15) hasta el 5,5% y se mantiene hasta la postlarva (día 20). El tercer componente son los glúcidos totales, con porcentajes que varían entre 0,4 y 1,5% a lo largo de todo el desarrollo larvario. Los ovocitos de *E. arcuatus* presentan un porcentaje de glúcidos del 1,2%, descendiendo significativamente al 95% de confianza en la larva D a 0,7%, continuando el descenso pero no siendo significativo entre el día 1 y el 8. A continuación, se produce un aumento significativo ($p<0,05$) en el día 15 siguiendo aumentando hasta alcanzar el 1,5%, pero sin presentar diferencias con el valor anterior.

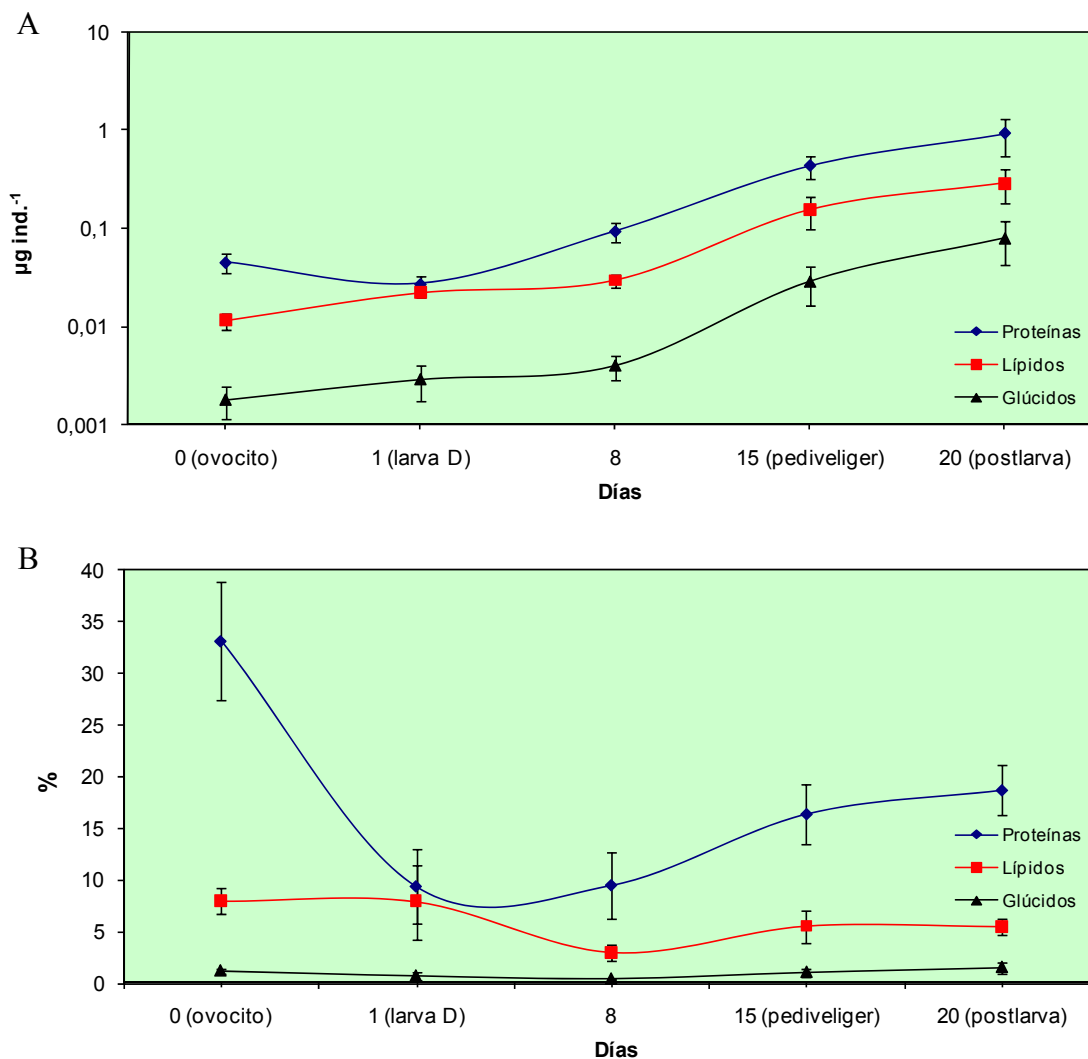


Fig. V.1. Evolución de los componentes bioquímicos en el desarrollo larvario de *E. arcuatus*. A. Expresado en $\mu\text{g ind.}^{-1}$. B. Expresado en porcentaje.

Los contenidos energéticos de todas las fases estudiadas y la variación entre ellas en las larvas de *E. arcuatus* muestran que el componente que más energía aporta son las proteínas (Tabla V.5). En la larva D (día 1) hay un descenso del 71,7% en las proteínas, pasando a ser, en la larva D, los lípidos los que aportan la mayor parte de la energía al contenido total de las larvas. En el paso del día 1 al 8, la energía está suministrada por los lípidos (62,2%) y los glúcidos (42,6%). En las siguientes fases se produce ganancia de energía en los distintos componentes bioquímicos, a excepción de los lípidos, en el paso de pediveliger a postlarva.

Tabla V.4. Niveles de significación del test U de Mann-Whitney para la variación del porcentaje de proteínas, lípidos y glúcidos entre estadios en los desarrollos larvarios de *E. arcuatus*. **Negrita:** diferencias significativas; *: diferencias significativas al 95% de confianza; **: diferencias significativas al 99% de confianza; sin asteriscos: diferencias no significativas.

| | Estadios | 0 (ovocito) | 1 (larva D) | 8 | 15 (pediveliger) | 20 (postlarva) |
|-----------|-------------|-------------|----------------|----------------|------------------|----------------|
| Proteínas | 0 (ovocito) | - | 0,004** | 0,004** | 0,004** | 0,004** |
| | 1 (larva D) | | - | 0,873 | 0,010* | 0,004** |
| | 8 | | | - | 0,010* | 0,004** |
| | 15 (pediv.) | | | | - | 0,262 |
| | 20 (postl.) | | | | | - |
| Lípidos | 0 (ovocito) | - | 0,749 | 0,004** | 0,016* | 0,016* |
| | 1 (larva D) | | - | 0,004** | 0,522 | 0,522 |
| | 8 | | | - | 0,025* | 0,004** |
| | 15 (pediv.) | | | | - | 1,000 |
| | 20 (postl.) | | | | | - |
| Glúcidos | 0 (ovocito) | - | 0,037* | 0,004** | 0,522 | 0,200 |
| | 1 (larva D) | | - | 0,078 | 0,109 | 0,010* |
| | 8 | | | - | 0,006* | 0,004** |
| | 15 (pediv.) | | | | - | 0,200 |
| | 20 (postl.) | | | | | - |

Tabla V.5. Contenido energético (kcal g^{-1}) de las principales reservas y utilización de la energía durante distintas fases del desarrollo larvario en *E. arcuatus*. Los equivalentes energéticos son 4,3 para proteínas; 8,42 para lípidos y 4,1 para glúcidos.

| Día | Lípidos | Proteínas | Glúcidos | Total | Variación (%) |
|-----|---------|-----------|----------|--------|---------------|
| 0 | 0,6705 | 1,4263 | 0,0487 | 2,1455 | |
| 1 | 0,6652 | 0,4036 | 0,0283 | 1,0971 | - 48,86 |
| 8 | 0,2514 | 0,4084 | 0,0462 | 0,6761 | - 38,37 |
| 15 | 0,4669 | 0,7047 | 0,0429 | 1,2146 | + 79,64 |
| 20 | 0,4629 | 0,8043 | 0,0625 | 1,3298 | + 9,47 |

El estudio de la correlación entre la composición bioquímica y otros parámetros que afectan al cultivo, como el tamaño, peso seco de ovocitos y larvas D y la supervivencia de las larvas D y en la fijación, permite saber la influencia de la bioquímica en el comportamiento de las larvas (Tabla V.6). La cantidad de glúcidos en los ovocitos se relaciona positivamente con la supervivencia en la larva D. Además, la cantidad total de los lípidos, proteínas y glúcidos presentes en el ovocito de esta especie, muestran una correlación positiva con la supervivencia en la fase de fijación.

La supervivencia en las larvas D veliger se correlaciona positivamente con la supervivencia en la fijación de las postlarvas.

Los tres componentes bioquímicos estudiados en las larvas D, expresados en contenido por individuo, muestran correlaciones positivas con la supervivencia en las larvas D y en fijación.

El diámetro de los ovocitos influye con una correlación negativa en la supervivencia en los dos períodos estudiados pero, por el contrario, la correlación es positiva con el peso seco de los ovocitos. La longitud de las larvas D no influye en la supervivencia de éstas, pero sí hay una correlación negativa con la supervivencia en la fijación. En la supervivencia en estas dos fases se muestra una correlación negativa con el peso seco de las larvas D.

Tabla V.6. Coeficiente de correlación de Spearman entre las composiciones bioquímicas, la supervivencia, el tamaño y peso seco de ovocitos y larvas D en *E. arcuatus*. Lp-hv: μg lípidos ovocito⁻¹; Pr-hv: μg proteínas ovocito⁻¹; Gl-hv: μg glúcidos ovocito⁻¹; Sup-LD: supervivencia en la larva D; Sup-Fij: supervivencia en la fijación; Lp-LD: μg lípidos larva D⁻¹; Pr-LD: μg proteínas larva D⁻¹; Gl-LD: μg glúcidos larva D⁻¹; L-hv: diámetro del ovocito; PS-hv: peso seco del ovocito; L-LD: longitud de la larva D; PS-LD: peso seco de la larva D. **Negrita:** correlación significativa; *: al 95% de confianza; **: al 99% de confianza; sin asteriscos: diferencias no significativas.

| | Pr-hv | Gl-hv | Sup-LD | Sup-Fij | Lp-LD | Pr-LD | Gl-LD | L-hv | PS-hv | L-LD | PS-LD |
|----------------|----------------|-------|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|
| Lp-hv | 0,800** | 0,600 | 0,264 | 0,791** | 0,900** | 0,700* | 0,700* | -0,264 | 0,900** | -0,791** | -0,600 |
| Pr-hv | | 0,600 | -0,105 | 0,632* | -0,100 | 0,500 | 0,200 | 0,105 | 0,600 | -0,949** | -0,600 |
| Gl-hv | | | 0,632* | 0,949** | 0,700* | 0,900** | 0,600 | -0,632* | 0,800** | -0,632* | -1,000** |
| Sup-LD | | | | 0,667* | 0,949** | 0,632* | 0,791** | -1,000** | 0,632* | 0,111 | -0,632* |
| Sup-Fij | | | | | 0,632* | 0,949** | 0,791* | -0,667* | 0,949** | -0,667* | -0,949** |
| Lp-LD | | | | | | 0,486 | 0,429 | -0,837** | 0,371 | 0,000 | -0,714** |
| Pr-LD | | | | | | | 0,486 | -0,239 | 0,543 | -0,118 | -0,886** |
| Gl-LD | | | | | | | | -0,717** | 0,943** | -0,500 | -0,543 |
| L-hv | | | | | | | | | -0,598* | 0,246 | 0,478 |
| PS-hv | | | | | | | | | | -0,706* | -0,657* |
| L-LD | | | | | | | | | | | 0,324 |

V.3.3.- Composición bioquímica de las larvas de longueirón (*Ensis siliqua*)

En *E. siliqua* el componente principal son las proteínas, tanto expresado en $\mu\text{g individuo}^{-1}$ como en porcentaje (Fig. V.2.A). Los ovocitos tienen un contenido en proteínas de $0,036 \mu\text{g ind.}^{-1}$ (Tabla V.7), no significativamente distinto del de la larva D ($0,035 \mu\text{g ind.}^{-1}$). Las proteínas aumentan significativamente en la pediveliger y en la postlarva. Los lípidos, inversamente a lo que ocurre con las proteínas, muestran un incremento significativo al 95% de confianza en su contenido desde ovocito hasta larva D. Este aumento en el contenido de lípidos también se produce en la pediveliger y postlarva. Los glúcidos tienen valores no significativamente distintos en ovocito y larva D, pero se produce un incremento significativo en los días 8 y 15.

Tabla V.7. Composición bioquímica en ovocitos y larvas de *E. siliqua* en los tres desarrollos larvarios seguidos y el desarrollo medio. Valores expresados en $\mu\text{g individuo}^{-1}$, como valores medios \pm desviación estándar por puesta ($n=2$) y desarrollo medio ($n=6$). En la puesta media las letras distintas indican diferencias significativas al 95% de confianza entre estadios (test U de Mann-Whitney).

| Puesta | Día | Lípidos | Proteínas | Glúcidos |
|--------|-----|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| P-1 | 0 | 0,0126 \pm 0,0008 | 0,0360 \pm 0,0047 | 0,0024 \pm 0,0004 |
| | 1 | 0,0234 \pm 0,0009 | 0,0331 \pm 0,0008 | 0,0026 \pm 0,0002 |
| | 8 | 0,0723 \pm 0,0032 | 0,3232 \pm 0,0356 | 0,0143 \pm 0,0012 |
| | 15 | 0,1921 \pm 0,0636 | 0,7180 \pm 0,0367 | 0,0611 \pm 0,0024 |
| P-2 | 0 | 0,0138 \pm 0,0013 | 0,0397 \pm 0,0017 | 0,0019 \pm 0,0001 |
| | 1 | 0,0181 \pm 0,0008 | 0,0371 \pm 0,0020 | 0,0021 \pm 0,0001 |
| | 8 | 0,0940 \pm 0,0038 | 0,2857 \pm 0,0061 | 0,0135 \pm 0,0001 |
| | 15 | 0,1977 \pm 0,0040 | 0,5641 \pm 0,0213 | 0,0399 \pm 0,0024 |
| P-3 | 0 | 0,0131 \pm 0,0000 | 0,0326 \pm 0,0032 | 0,0012 \pm 0,0000 |
| | 1 | 0,0252 \pm 0,0032 | 0,0355 \pm 0,0026 | 0,0017 \pm 0,0002 |
| | 8 | 0,0481 \pm 0,0002 | 0,1697 \pm 0,0019 | 0,0087 \pm 0,0006 |
| | 15 | 0,1143 \pm 0,0120 | 0,4285 \pm 0,0204 | 0,0261 \pm 0,0024 |
| Media | 0 | 0,0132 \pm 0,0009 ^a | 0,0361 \pm 0,0041 ^a | 0,0018 \pm 0,0006 ^a |
| | 1 | 0,0223 \pm 0,0037 ^b | 0,0352 \pm 0,0023 ^a | 0,0022 \pm 0,0004 ^a |
| | 8 | 0,0715 \pm 0,0207 ^c | 0,2596 \pm 0,0733 ^b | 0,0122 \pm 0,0028 ^b |
| | 15 | 0,1681 \pm 0,0508 ^d | 0,5702 \pm 0,1312 ^c | 0,0424 \pm 0,0159 ^c |

El porcentaje de proteínas en los ovocitos es del 23,5% (Fig. V.2.B), descendiendo significativamente ($p<0,05$) en la larva D hasta 14,3% (Tabla V.8). En la pediveliger y postlarva los valores son similares, con un ligero incremento hasta 16,8%, que no es significativo. En los lípidos se produce un ligero aumento de ovocito a larva D veliger, pero este no es significativo. En la transición de larva D a pediveliger, el porcentaje se reduce significativamente ($p<0,05$) de 9,9 a 4,2%, pasando a 5,0% en las postlarvas.

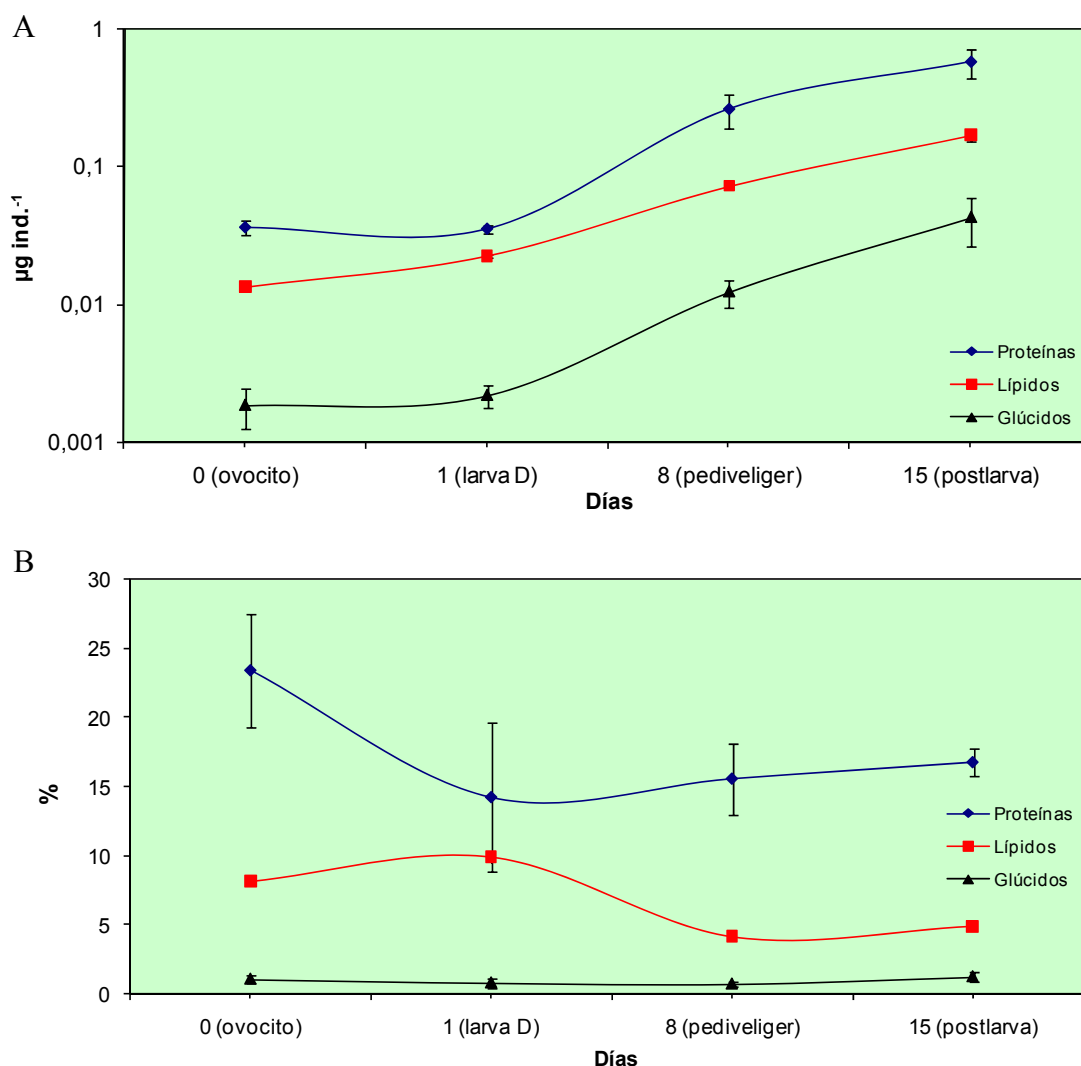


Fig. V.2. Evolución de los componentes bioquímicos en el desarrollo larvario de *E. siliqua*. A. Expresado en $\mu\text{g ind.}^{-1}$. B. Expresado en porcentaje.

Los glúcidos, expresados en porcentaje, se reducen ligeramente de ovocito (1,11%) a larva D, y continúa el descenso hasta la pediveliger (0,74%). En la postlarva se produce un aumento significativo al 99% de confianza hasta 1,28%.

La utilización de la energía a lo largo del desarrollo larvario en *E. siliqua* está basada principalmente en las proteínas, a excepción de que los lípidos en la larvas D son los que aportan un mayor contenido energético (Tabla V.9). Así, el paso de ovocito a larva D está sustentado por descensos en el contenido energético de las proteínas (39,0%) y glúcidos (24,9%). Por el contrario, en el paso desde larva D hasta pediveliger la energía utilizada proviene de los lípidos principalmente y, en menor medida, de los

glúcidos. Al formarse la postlarva hay una ganancia neta de todos los componentes bioquímicos.

Tabla V.8. Niveles de significación del test U de Mann-Whitney para la variación del porcentaje de proteínas, lípidos y glúcidos entre estadios en los desarrollos larvarios de *E. siliqua*. **Negrita:** diferencias significativas; *: diferencias significativas al 95% de confianza; **: diferencias significativas al 99% de confianza; sin asteriscos: diferencias no significativas.

| | Estadios | 0 (ovocito) | 1 (larva D) | 8 (pediveliger) | 15 (postlarva) |
|-----------|-------------|-------------|---------------|-----------------|----------------|
| Proteínas | 0 (ovocito) | - | 0,025* | 0,006** | 0,004** |
| | 1 (larva D) | | - | 0,337 | 0,337 |
| | 8 (pediv.) | | | - | 0,150 |
| | 15 (postl.) | | | | - |
| Lípidos | 0 (ovocito) | - | 0,150 | 0,004** | 0,004** |
| | 1 (larva D) | | - | 0,004** | 0,010* |
| | 8 (pediv.) | | | - | 0,262 |
| | 15 (postl.) | | | | - |
| Glúcidos | 0 (ovocito) | - | 0,150 | 0,010* | 0,200 |
| | 1 (larva D) | | - | 0,522 | 0,109 |
| | 8 (pediv.) | | | - | 0,004** |
| | 15 (postl.) | | | | - |

Tabla V.9. Contenido energético (kcal g^{-1}) de las principales reservas y utilización de la energía durante distintas fases del desarrollo larvario en *E. siliqua*. Los equivalentes energéticos son 4,3 para proteínas; 8,42 para lípidos y 4,1 para glúcidos.

| Día | Lípidos | Proteínas | Glúcidos | Total | Variación (%) |
|-----|---------|-----------|----------|--------|---------------|
| 0 | 0,6887 | 1,0089 | 0,0453 | 1,7431 | |
| 1 | 0,8364 | 0,6151 | 0,0340 | 1,4855 | - 14,77 |
| 8 | 0,3554 | 0,6725 | 0,0307 | 1,0587 | - 28,73 |
| 15 | 0,4187 | 0,7236 | 0,0527 | 1,1951 | + 12,88 |

La cantidad de glúcidos en los ovocitos y larvas D de *E. siliqua* muestra una correlación negativa altamente significativa con la supervivencia en las larvas D veliger (Tabla V.10).

Los lípidos, expresados en contenido total por individuo en las larvas D, se correlacionan negativamente con la supervivencia en la fijación, mientras que las proteínas lo hacen positivamente.

Entre la longitud de las larvas D veliger y la supervivencia en las larvas D existe una correlación positiva, y lo mismo sucede con el peso seco en esta fase. Además, el peso seco en las larvas D veliger presenta una correlación positiva altamente significativa con la supervivencia en la fijación.

Tabla V.10. Coeficiente de correlación de Spearman entre las composiciones bioquímicas, la supervivencia, el tamaño y peso seco de ovocitos y larvas *D* en *E. siliqua*. Lp-hv: μg lípidos ovocito⁻¹; Pr-hv: μg proteínas ovocito⁻¹; Gl-hv: μg glúcidos ovocito⁻¹; Sup-LD: supervivencia en la larva *D*; Sup-Fij: supervivencia en la fijación; Lp-LD: μg lípidos larva *D*⁻¹; Pr-LD: μg proteínas larva *D*⁻¹; Gl-LD: μg glúcidos larva *D*⁻¹; L-hv: diámetro del ovocito; PS-hv: peso seco del ovocito; L-LD: longitud de la larva *D*; PS-LD: peso seco de la larva *D*. **Negrita:** correlación significativa; *: al 95% de confianza; **: al 99% de confianza; sin asteriscos: diferencias no significativas.

| | Pr-hv | Gl-hv | Sup-LD | Sup-Fij | Lp-LD | Pr-LD | Gl-LD | L-hv | PS-hv | L-LD | PS-LD |
|----------------|--------|--------|-----------------|---------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|
| Lp-hv | -0,543 | -0,143 | 0,120 | 0,239 | 0,029 | 0,714** | -0,086 | 0,120 | 0,143 | 0,120 | 0,600* |
| Pr-hv | | 0,371 | -0,359 | 0,359 | -0,829** | -0,200 | 0,257 | 0,717** | 0,657* | -0,359 | -0,143 |
| Gl-hv | | | -0,956** | -0,478 | -0,200 | -0,429 | 0,943** | 0,478 | 0,371 | -0,956** | -0,657* |
| Sup-LD | | | | 0,500 | 0,239 | 0,359 | -0,956** | -0,500 | -0,478 | 1,000** | 0,598* |
| Sup-Fij | | | | | -0,598* | 0,717* | -0,478 | 0,500 | 0,478 | 0,500 | 0,837** |
| Lp-LD | | | | | | -0,200 | -0,086 | -0,837** | -0,829** | 0,239 | -0,257 |
| Pr-LD | | | | | | | -0,257 | 0,359 | 0,429 | 0,359 | 0,943** |
| Gl-LD | | | | | | | | 0,478 | 0,429 | -0,956** | -0,543 |
| L-hv | | | | | | | | | 0,956** | -0,500 | 0,239 |
| PS-hv | | | | | | | | | | -0,478 | 0,314 |
| L-LD | | | | | | | | | | | 0,598* |

V.3.4.- Composición bioquímica de las larvas de longueirón vello (*Solen marginatus*)

En *S. marginatus* el componente bioquímico principal son las proteínas (Tabla V.11). En los ovocitos hay un ligero descenso en su paso a larva D, pero éste no es significativo ($p>0,05$) (Fig. V.3.A). En la pediveliger (día 5) hay un aumento significativo con respecto al estadio anterior, continuando el incremento significativo hasta la postlarva (día 9). Los lípidos y glúcidos siguen el mismo patrón que las proteínas, con ligeros descensos no significativos ($p>0,05$) de ovocito a larva D veliger, y aumentos significativos en pediveliger y postlarva.

Tabla V.11. Composición bioquímica en ovocitos y larvas de *S. marginatus* en los dos desarrollos larvarios seguidos y el desarrollo medio. Valores expresados en $\mu\text{g individuo}^{-1}$, como valores medios \pm desviación estándar por puesta ($n=2$) y desarrollo medio ($n=4$). En la puesta media las letras distintas indican diferencias significativas al 95% de confianza entre estadios (test U de Mann-Whitney).

| Puesta | Día | Lípidos | Proteínas | Glúcidos |
|--------|-----|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| P-1 | 0 | 0,0467 \pm 0,0005 | 0,0839 \pm 0,0078 | 0,0039 \pm 0,0009 |
| | 1 | 0,0466 \pm 0,0019 | 0,0744 \pm 0,0012 | 0,0026 \pm 0,0005 |
| | 5 | 0,0555 \pm 0,0034 | 0,1681 \pm 0,0248 | 0,0092 \pm 0,0002 |
| | 9 | 0,1288 \pm 0,0122 | 0,3829 \pm 0,0215 | 0,0545 \pm 0,0019 |
| P-2 | 0 | 0,0277 \pm 0,0009 | 0,0710 \pm 0,0035 | 0,0025 \pm 0,0004 |
| | 1 | 0,0276 \pm 0,0004 | 0,0597 \pm 0,0042 | 0,0012 \pm 0,0000 |
| | 5 | 0,0683 \pm 0,0051 | 0,2016 \pm 0,0043 | 0,0146 \pm 0,0013 |
| | 9 | 0,1027 \pm 0,0012 | 0,3947 \pm 0,0301 | 0,0305 \pm 0,0006 |
| Media | 0 | 0,0372 \pm 0,0110 ^a | 0,0775 \pm 0,0089 ^a | 0,0032 \pm 0,0001 ^a |
| | 1 | 0,0371 \pm 0,0110 ^a | 0,0657 \pm 0,0104 ^a | 0,0019 \pm 0,0008 ^a |
| | 5 | 0,0619 \pm 0,0082 ^b | 0,1849 \pm 0,0241 ^b | 0,0119 \pm 0,0031 ^b |
| | 9 | 0,1158 \pm 0,0167 ^c | 0,3888 \pm 0,0227 ^c | 0,0425 \pm 0,0138 ^c |

Los porcentajes de proteínas en ovocitos, larva D y pediveliger varían entre 13,05 y 13,75% (Fig. V.3.B), no presentando diferencias significativas al 95% de confianza (Tabla V.12). En la postlarva el porcentaje de proteínas aumenta significativamente ($p<0,05$) hasta el 17,81%. Porcentualmente, los lípidos aumentan en la larva D (día 1), para descender y volver a aumentar en pediveliger y postlarva, respectivamente. Los glúcidos descienden en la larva D veliger con respecto a los ovocitos, para aumentar significativamente ($p<0,05$) en pediveliger y postlarva.

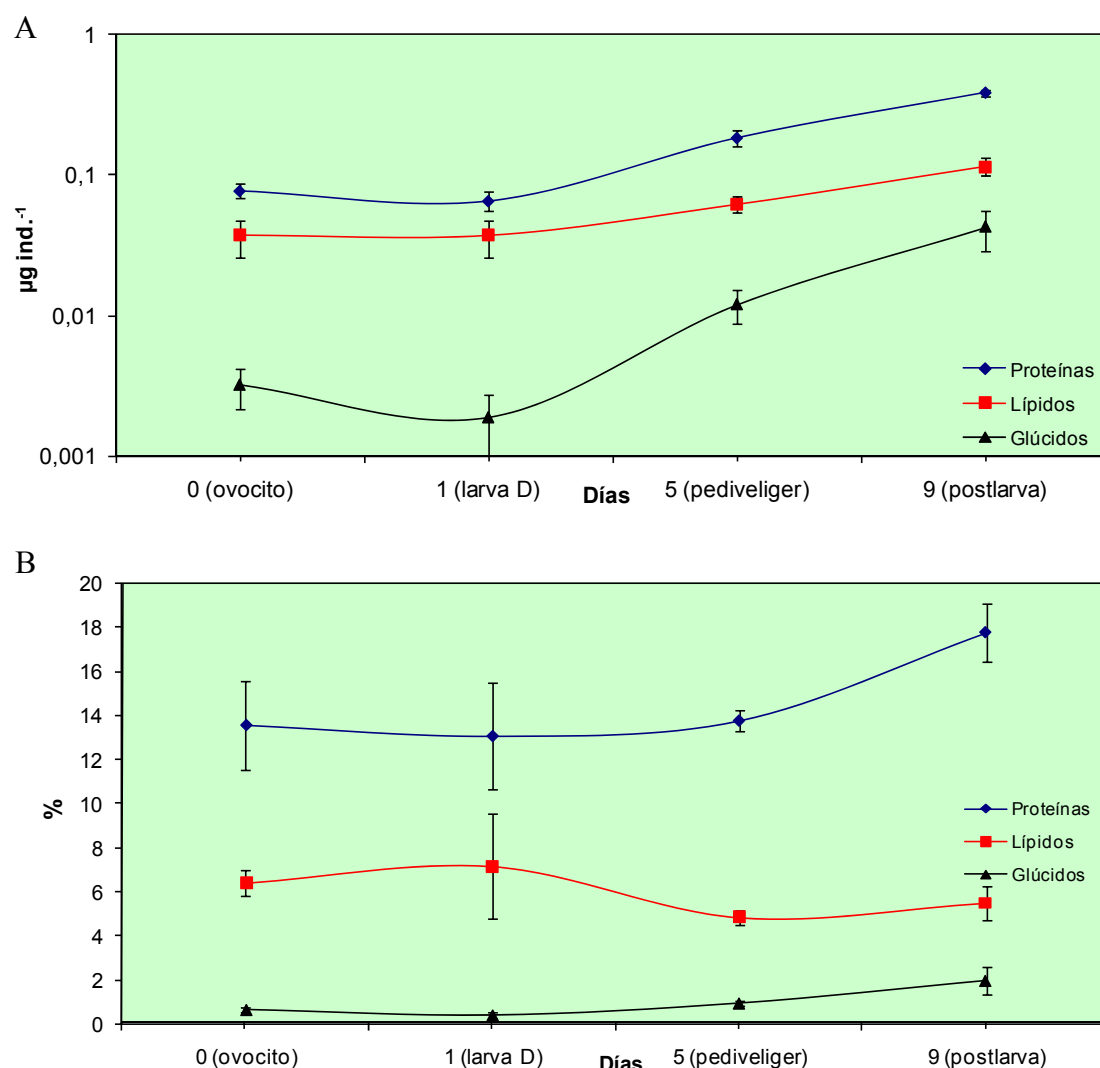


Fig. V.3. Evolución de los componentes bioquímicos en el desarrollo larvario de *S. marginatus*. A. Expresado en $\mu\text{g ind.}^{-1}$. B. Expresado en porcentaje.

Tabla V.12. Niveles de significación del test U de Mann-Whitney para la variación del porcentaje de proteínas, lípidos y glúcidos entre estadios en los desarrollos larvarios de *S. marginatus*. **Negrita:** diferencias significativas; *: diferencias significativas al 95% de confianza; **: diferencias significativas al 99% de confianza; sin asteriscos: diferencias no significativas.

| | Estadios | 0 (ovocito) | 1 (larva D) | 5 (pediveliger) | 9 (postlarva) |
|-----------|-------------|-------------|-------------|-----------------|---------------|
| Proteínas | 0 (ovocito) | - | 0,773 | 1,000 | 0,021* |
| | 1 (larva D) | - | - | 0,248 | 0,043* |
| | 5 (pediv.) | - | - | - | 0,021* |
| | 9 (postl.) | - | - | - | - |
| Lípidos | 0 (ovocito) | - | 1,000 | 0,021* | 0,248 |
| | 1 (larva D) | - | - | 0,083 | 0,248 |
| | 5 (pediv.) | - | - | - | 0,148 |
| | 9 (postl.) | - | - | - | - |
| Glúcidos | 0 (ovocito) | - | 0,083 | 0,021* | 0,021* |
| | 1 (larva D) | - | - | 0,021* | 0,021* |
| | 5 (pediv.) | - | - | - | 0,021* |
| | 9 (postl.) | - | - | - | - |

En *S. marginatus* se produce una ganancia de energía de ovocito a larva D (Tabla V.13). La contribución al gasto de energía en esta fase la aportan principalmente los glúcidos (-41,7%) y las proteínas (-3,7%), aunque se produce una ganancia neta debido a la ganancia en energía por los lípidos (+11,9%). Sin embargo, en la siguiente fase se produce una pérdida energética debida principalmente a los lípidos y glúcidos, para alcanzar el estadio de postlarva con una ganancia.

Tabla V.13. Contenido energético (kcal g^{-1}) de las principales reservas y utilización de la energía durante distintas fases del desarrollo larvario en *S. marginatus*. Los equivalentes energéticos son 4,3 para proteínas; 8,42 para lípidos y 4,1 para glúcidos.

| Día | Lípidos | Proteínas | Glúcidos | Total | Variación (%) |
|-----|---------|-----------|----------|--------|---------------|
| 0 | 0,5367 | 0,5810 | 0,0251 | 1,1428 | |
| 1 | 0,6004 | 0,5595 | 0,0146 | 1,1746 | + 2,77 |
| 5 | 0,4032 | 0,5896 | 0,0372 | 1,0299 | - 12,31 |
| 9 | 0,4592 | 0,7620 | 0,0800 | 1,3012 | + 26,34 |

Existe una correlación negativa significativa entre el contenido en microgramos de todos los componentes bioquímicos estudiados en los ovocitos de *S. marginatus* con la supervivencia en la fase de larva D y en la fijación (Tabla V.14). El contenido de lípidos, proteínas y glúcidos en microgramos por individuo en ovocitos, se correlaciona positivamente con el tamaño y peso seco de los ovocitos.

Tabla V.14. Coeficiente de correlación de Spearman entre las composiciones bioquímicas, la supervivencia, el tamaño y peso seco de ovocitos y larvas D en *S. marginatus*. Lp-hv: μg lípidos ovocito⁻¹; Pr-hv: μg proteínas ovocito⁻¹; Gl-hv: μg glúcidos ovocito⁻¹; Sup-LD: supervivencia en la larva D; Sup-Fij: supervivencia en la fijación; Lp-LD: μg lípidos larva D⁻¹; Pr-LD: μg proteínas larva D⁻¹; Gl-LD: μg glúcidos larva D⁻¹; L-hv: diámetro del ovocito; PS-hv: peso seco del ovocito; L-LD: longitud de la larva D; PS-LD: peso seco de la larva D. **Negrita:** correlación significativa; *: al 95% de confianza; **: al 99% de confianza; sin asteriscos: diferencias no significativas.

| | Pr-hv | Gl-hv | Sup-LD | Sup-Fij | Lp-LD | Pr-LD | Gl-LD | L-hv | PS-hv | L-LD | PS-LD |
|---------|---------------|---------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|----------------|-----------------|-----------------|--------|
| Lp-hv | 0,800* | 0,600 | -0,894** | -0,894** | 0,800** | 0,600 | 0,600 | 0,894** | 0,800* | -0,894** | 0,200 |
| Pr-hv | | 0,800* | -0,894** | -0,894** | 0,600 | 0,800* | 0,800* | 0,894** | 1,000** | -0,894** | -0,400 |
| Gl-hv | | | -0,894** | -0,894** | 0,800** | 1,000** | 1,000** | 0,894** | 0,800* | -0,894** | -0,200 |
| Sup-LD | | | | 1,000** | -0,894** | -0,894** | -0,894** | 1,000** | -0,894** | 1,000** | 0,000 |
| Sup-Fij | | | | | -0,894** | -0,894** | -0,894** | 1,000** | -0,894** | 1,000** | 0,000 |
| Lp-LD | | | | | | 0,800* | 0,800* | 0,894** | 0,600 | -0,894** | 0,400 |
| Pr-LD | | | | | | | 1,000** | 0,894** | 0,800* | -0,894** | 0,400 |
| Gl-LD | | | | | | | | 0,894** | 0,800* | -0,894** | -0,200 |
| L-hv | | | | | | | | | 0,894** | -1,000** | 0,000 |
| PS-hv | | | | | | | | | | -0,894** | -0,400 |
| L-LD | | | | | | | | | | | 0,000 |

Analizando los contenidos de todos los componentes en cantidad total en la larva D veliger la correlación con la supervivencia en las dos fases estudiadas, es también negativa. En las larvas D hay una correlación negativa entre el tamaño de las larvas D y el contenido bioquímico en porcentaje y microgramos por individuo.

V.3.5.- Comparativa entre especies

Las tres especies de solénidos estudiadas en este trabajo presentan comportamientos distintos (Tabla V.15), haciéndose más destacables las diferencias si se estudian las composiciones expresadas como $\mu\text{g ind.}^{-1}$ (Fig. V.4). Se debe tener en cuenta que se han agrupado en ovocito, larva D, pediveliger y postlarva según lo descrito en el apartado III.2.5.1., correspondiéndose en el caso de los dos primeros estadios a los mismos días de cultivo en las tres especies, pero no en la pediveliger y postlarva, que difieren según las especies.

Tabla V.15. Niveles de significación del test U de Mann-Whitney para las comparaciones dos a dos de los componentes bioquímicos entre especies en los distintos estadios larvarios, expresados en $\mu\text{g individuo}^{-1}$. **Negrita:** diferencias significativas; *: diferencias significativas al 95% de confianza; **: diferencias significativas al 99% de confianza; sin asteriscos: diferencias no significativas.

| | Estadios | <i>E. arcuatus</i> - <i>E. siliqua</i> | <i>E. arcuatus</i> - <i>S. marginatus</i> | <i>E. siliqua</i> - <i>S. marginatus</i> |
|-----------|-------------|---|--|---|
| Proteínas | ovocito | 0,078 | 0,055 | 0,011* |
| | larva D | 0,006** | 0,011* | 0,011* |
| | pediveliger | 0,037* | 0,011* | 0,201 |
| | postlarva | 0,109 | 0,011* | 0,019* |
| Lípidos | ovocito | 0,749 | 0,042* | 0,011* |
| | larva D | 0,631 | 0,011* | 0,019* |
| | pediveliger | 0,010* | 0,011* | 0,522 |
| | postlarva | 0,055 | 0,011* | 0,055 |
| Glúcidos | ovocito | 0,631 | 0,165 | 0,019* |
| | larva D | 0,200 | 0,257 | 0,522 |
| | pediveliger | 0,004** | 0,019* | 0,670 |
| | postlarva | 0,109 | 0,088 | 1,000 |

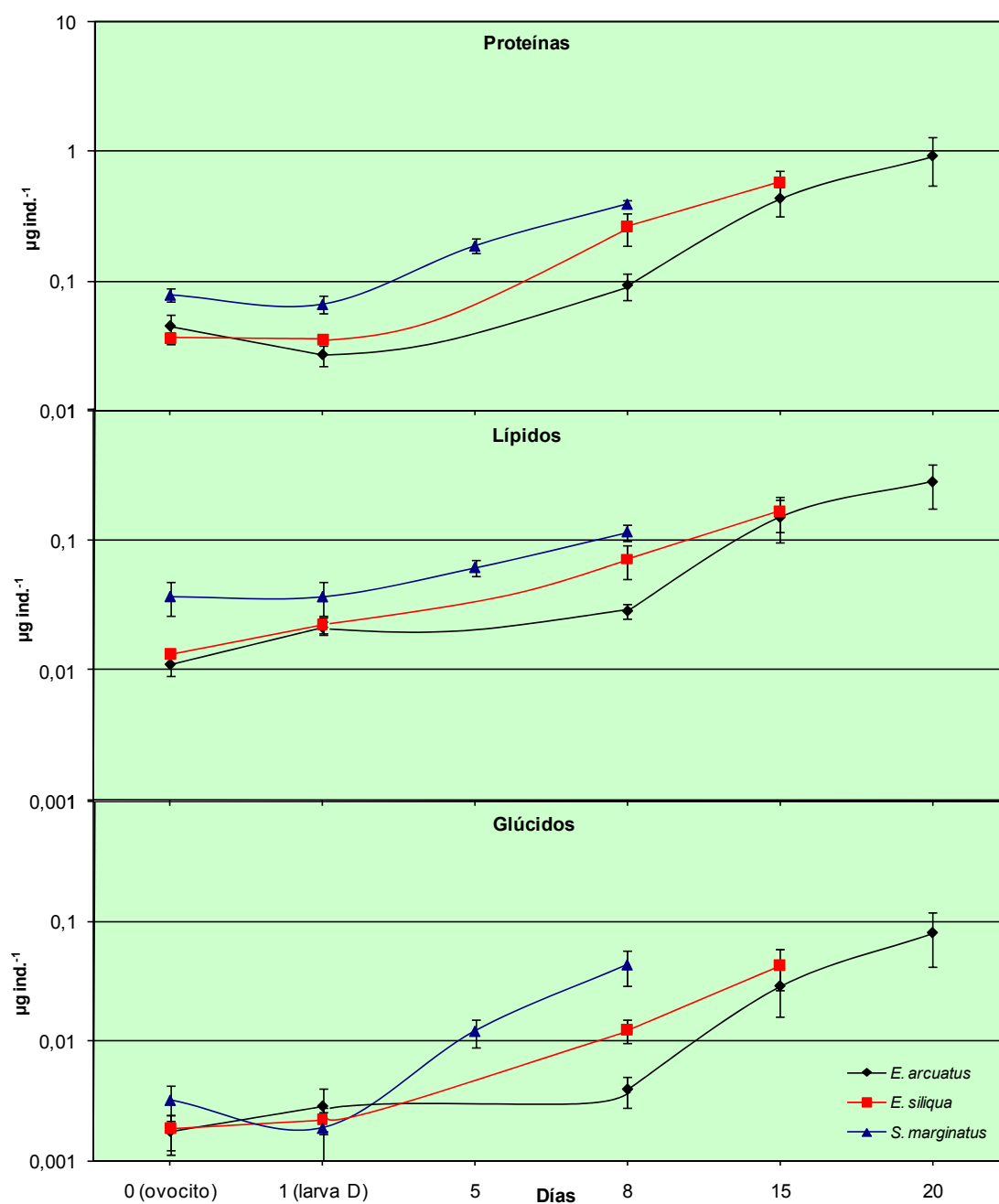


Fig. V.4. Evolución de proteínas, lípidos y glúcidos expresados en $\mu\text{g individuo}^{-1}$ en *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*.

Los ovocitos de las dos especies de *Ensis* estudiadas son similares en composición bioquímica ($p > 0,05$). Sin embargo, los ovocitos de *S. marginatus* se diferencian significativamente al 95% de confianza de los de *E. arcuatus* en el contenido en lípidos y de los de *E. siliqua* en lípidos, proteínas y glúcidos.

En las proteínas de las larvas D existen diferencias significativas entre las tres especies ($p < 0,05$). Pero en los contenidos lipídicos *E. arcuatus* y *E. siliqua* no presentan diferencias, como en los ovocitos, pero sí existen diferencias significativas de *Solen* con las dos especies de *Ensis*, como en los ovocitos. En los glúcidos no existen diferencias significativas entre las tres especies.

Las pediveliger de *E. arcuatus* presentan diferencias significativas ($p < 0,05$) con las de *E. siliqua* y *S. marginatus* en proteínas, lípidos y glúcidos.

Las postlarvas de *E. arcuatus* difieren en su contenido en proteínas y lípidos con *S. marginatus*, y el contenido de proteínas en *E. siliqua* es significativamente superior al de *S. marginatus*.

En cuanto a las evoluciones de los distintos componentes bioquímicos, lo más destacable se puede ver en el paso de ovocito a larva D veliger (Fig. V.4). El contenido en proteínas baja en las tres especies, pero en *E. arcuatus* se produjo un descenso más brusco. Sin embargo, en los lípidos en las dos especies de *Ensis* se produce un incremento entre estos dos estadios, mientras que en *S. marginatus* se mantiene. En lo referente a los glúcidos es totalmente distinto entre especies, en *S. marginatus* baja, sube en *E. arcuatus* y prácticamente se mantiene en *E. siliqua*.

En la evolución de los componentes bioquímicos desde la larva D hasta la postlarva se produce un aumento generalizado. Las postlarvas de *S. marginatus* presentan contenidos de proteínas, lípidos y glúcidos en $\mu\text{g ind.}^{-1}$ menores que las otras dos especies. En *E. arcuatus* se observa un aumento más lento entre el día 1 y el 8 de la composición bioquímica, sobre todo en lípidos y glúcidos.

Las comparaciones de los porcentajes de componentes bioquímicos entre las especies presentan menos diferencias que si se expresan como $\mu\text{g ind.}^{-1}$ (Tabla V.16). Las tres especies presentan diferencias significativas en los porcentajes de proteínas en los ovocitos ($p < 0,05$). Además, *E. siliqua* y *S. marginatus* presentan diferencias en los porcentajes de glúcidos en todos los estadios, a excepción de las pediveliger.

Tabla V.16. Niveles de significación del test U de Mann-Whitney para las comparaciones dos a dos de los componentes bioquímicos entre especies en los distintos estadios larvares, expresados en porcentaje. **Negrita:** diferencias significativas; *: diferencias significativas al 95% de confianza; **: diferencias significativas al 99% de confianza; sin asteriscos: diferencias no significativas.

| | Estadios | <i>E. arcuatus</i> - <i>E. siliqua</i> | <i>E. arcuatus</i> - <i>S. marginatus</i> | <i>E. siliqua</i> - <i>S. marginatus</i> |
|-----------|-------------|---|--|---|
| Proteínas | ovocito | 0,016* | 0,011* | 0,011* |
| | larva D | 0,200 | 0,201 | 1,000 |
| | pediveliger | 0,631 | 0,088 | 0,136 |
| | postlarva | 0,200 | 0,670 | 0,394 |
| Lípidos | ovocito | 0,873 | 0,136 | 0,033* |
| | larva D | 0,200 | 0,831 | 0,088 |
| | pediveliger | 0,055 | 0,136 | 0,088 |
| | postlarva | 0,423 | 0,831 | 0,394 |
| Glúcidos | ovocito | 0,522 | 0,011* | 0,011* |
| | larva D | 0,522 | 0,088 | 0,033* |
| | pediveliger | 0,262 | 0,670 | 0,055 |
| | postlarva | 0,522 | 0,136 | 0,033* |

V.4.- DISCUSIÓN

El almacenamiento de reservas y la supervivencia de las larvas depende mucho de la calidad del alimento suministrado (Whyte, 1987). El fitoplancton empleado como alimento debe proporcionar energía y nutrientes esenciales. Aunque se conoce poco sobre los requerimientos nutricionales de bivalvos (Langdon, 1982), los lípidos, carbohidratos y proteínas son la fuente de energía para el crecimiento y desarrollo.

Las dietas microalgales ricas en ácidos grasos poliinsaturados y con altos niveles de carbohidratos, producen los mejores resultados de crecimiento en juveniles de la ostra europea *Ostrea edulis* (Enright *et al.*, 1986b) y en las larvas del pectínido *Patinopecten yessoensis* (Whyte *et al.*, 1989). Otros autores apuntan que las dietas ricas en proteínas son las mejores para el crecimiento, como en los juveniles del mitílido *Mytilus trossulus* (Kreeger & Langdon, 1993), en los juveniles de la almeja *Tapes japonica* (Langton *et al.*, 1977) o en las larvas del ostreido *Crassostrea virginica* (Webb & Chu, 1982). Sedano (1992), apuntaba que las dietas con niveles altos de proteínas y lípidos producen larvas del mitílido *Mytilus galloprovincialis* más favorecidas desde el punto de vista energético, y por lo tanto con mejores crecimientos y supervivencias.

Debido a la importancia de la composición bioquímica de las microalgas suministradas como dieta y a las diferencias en composición que se pueden dar según el método de cultivo, se ha analizado la composición de la mezcla de microalgas suministrada como dieta (Tabla V.17). Brown *et al.* (1997) analizaron la composición bioquímica de 40 especies de microalgas, encontrando que las proteínas variaban entre 6 y 52%, los lípidos entre 7 y 23% y los carbohidratos entre 5 y 23%. La composición de la dieta suministrada en este estudio se encuentra en los rangos de las especies analizadas, por lo que se puede asumir que es una dieta equilibrada.

La embriogénesis, el primer cambio anatómico de ovocito a veliger, se realiza con reservas endógenas suministradas a los ovocitos por los progenitores. Por lo tanto, la composición bioquímica de la gónada de los reproductores va a influir en la cantidad y calidad de las reservas transferidas a los ovocitos, que serán necesarias durante un período lecitotrófico de alimentación como es el desarrollo embrionario.

Tabla V.17. Composición bioquímica de las microalgas usadas en este trabajo expresada en porcentaje. Dieta suministrada compuesta por *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros calcitrans* y *Tetraselmis suecica*, expresada en porcentaje con respecto al peso seco. Los datos de la composición bioquímica procedentes de Fernández-Reiriz et al. (1989) están expresados en porcentaje con respecto a la materia orgánica y las cenizas en porcentaje. Los datos recogidos de Whyte (1987) y Brown (1991) se expresan en porcentaje con respecto al peso seco.

| Especies | Proteínas (%) | Lípidos (%) | Carbohidratos (%) | Cenizas (%) | Autores |
|-------------------------------|---------------|-------------|-------------------|-------------|--------------------------------|
| Dieta suministrada | 23,50 | 21,30 | 3,60 | - | Presente estudio |
| <i>Pavlova lutheri</i> | 35,55 | 38,88 | 18,53 | 55,09 | Fernández-Reiriz et al. (1989) |
| <i>P. lutheri</i> | 29,00 | 12,00 | 9,00 | - | Brown (1991) |
| <i>Isochrysis galbana</i> | 39,97 | 28,60 | 15,21 | 49,01 | Fernández-Reiriz et al. (1989) |
| <i>I. galbana</i> | 28,06 | 19,92 | 4,40 | 12,61 | Whyte (1987) |
| <i>I. galbana</i> | 29,00 | 23,00 | 12,90 | - | Brown (1991) |
| <i>Chaetoceros calcitrans</i> | 2,60 | 11,76 | 2,42 | 69,33 | Fernández-Reiriz et al. (1989) |
| <i>C. calcitrans</i> | 22,94 | 14,39 | 11,09 | 26,60 | Whyte (1987) |
| <i>C. calcitrans</i> | 34,00 | 16,00 | 6,00 | - | Brown (1991) |
| <i>Tetraselmis suecica</i> | 40,85 | 24,46 | 12,30 | 27,95 | Fernández-Reiriz et al. (1989) |
| <i>T. suecica</i> | 34,25 | 5,85 | 8,30 | 22,46 | Whyte (1987) |
| <i>T. suecica</i> | 31,00 | 17,00 | 12,10 | - | Brown (1991) |

Martínez (1991) muestra que las hembras maduras del pectínido *Argopecten purpuratus* poseen un contenido significativamente más elevado de lípidos y proteínas que los machos maduros, lo cual sugiere que estos componentes son importantes para los estadios larvarios, probablemente el alto contenido en reservas de energía sea para la utilización a lo largo de la embriogénesis en una alta actividad morfogénica (Whyte et al., 1987). Sin embargo, en *Ensis arcuatus* el contenido de lípidos totales y triglicéridos sí que es más elevado en las hembras que en los machos, pero esto no sucede en las proteínas (Darriba, 2001). Para *E. siliqua* y *Solen marginatus*, Martínez (2002) no posee datos de composiciones de lípidos y proteínas de la gónada separada por sexos por lo que no se puede establecer una comparación clara. Esta autora aporta datos de las composiciones de ácidos grasos separando en familias de lípidos neutros y polares en masa visceral más gónada diferenciada por sexos en la época de madurez en estas especies. En *S. marginatus* es muy superior la cantidad de lípidos neutros (de reserva) presente en las hembras comparado con los machos y en *E. siliqua* esta diferencia es menor.

Las proteínas son el componente principal en los ovocitos de estas tres especies de solénidos, como sucede en otros bivalvos marinos estudiados (Tabla V.18). Pero si comparamos los valores de los porcentajes en *Ensis* y *Solen* con los de otras especies se puede apreciar como en general son más bajos. En el caso de *S. marginatus*, el

porcentaje bajo podría deberse a la presencia de la envuelta coriónica, puesto que debido a su composición podría no ser cuantificada totalmente por los métodos bioquímicos usados en este trabajo. Además, existe un desequilibrio marcado entre el contenido de proteínas y el de lípidos, como en la mayoría de las especies de bivalvos, a excepción del pectínido *Argopecten purpuratus* (Fariás *et al.*, 1998).

Tabla V.18. Composición bioquímica de los ovocitos no fecundados de algunos bivalvos expresados como porcentaje respecto al peso seco total. En Fariás *et al.* (1998) y en Honkoop *et al.* (1999) los resultados se expresan en porcentaje de peso seco libre de cenizas.

| Especie | Lípidos (%) | Proteínas (%) | Glúcidos (%) | Autores |
|---------------------------------|-------------|---------------|--------------|-------------------------------|
| <i>Ensis arcuatus</i> | 7,9 | 33,2 | 1,2 | Presente estudio |
| <i>E. siliqua</i> | 8,2 | 23,5 | 1,1 | Presente estudio |
| <i>Solen marginatus</i> | 6,4 | 13,5 | 0,6 | Presente estudio |
| <i>Placopecten magellanicus</i> | 13,8 | 68,1 | 2,6 | Holland (1978) |
| <i>Spisula solidissima</i> | 13,6 | 65,5 | 3,1 | Holland (1978) |
| <i>Mya truncata</i> | 13,0 | 40,0 | 1,2 | Holland (1978) |
| <i>Mytilus edulis</i> | 12,1 | 60,6 | 1,5 | Holland (1978) |
| <i>M. edulis</i> | 18,3 | 36,6 | 2,3 | Gabbott (1983) |
| <i>M. edulis</i> | 20,0 | - | - | Honkoop <i>et al.</i> (1999) |
| <i>M. galloprovincialis</i> | 14,2 | 28,6 | 1,9 | Sedano (1992) |
| <i>Crassostrea virginica</i> | 23,0 | - | - | Gallager <i>et al.</i> (1986) |
| <i>Crassostrea virginica</i> | 13,5 | - | - | Gallager <i>et al.</i> (1986) |
| <i>Mercenaria mercenaria</i> | 6,1 | - | - | Gallager <i>et al.</i> (1986) |
| <i>Crassadoma gigantea</i> | 24,5 | 56,2 | 8,5 | Whyte <i>et al.</i> (1990a) |
| <i>Patinopecten yessoensis</i> | 26,8 | 53,4 | 6,3 | Whyte <i>et al.</i> (1991) |
| <i>Argopecten purpuratus</i> | 34,1 | 38,2 | 1,5 | Fariás <i>et al.</i> (1998) |
| <i>Cerastoderma edule</i> | 11,4 | - | - | Honkoop <i>et al.</i> (1999) |
| <i>Macoma balthica</i> | 32,5 | - | - | Honkoop <i>et al.</i> (1999) |

El estudio de la composición bioquímica de los ovocitos, así como el seguimiento durante distintas fases del desarrollo larvario, expresando los datos como porcentaje relativo al peso seco, no nos da una idea clara de cómo es la utilización exacta de las distintas reservas bioquímicas. El contenido de los distintos componentes bioquímicos en $\mu\text{g ind.}^{-1}$ es mucho más informativo de las evoluciones y tendencias del almacenamiento y consumo de los diversos sustratos energéticos.

Los ovocitos de *E. arcuatus* y *E. siliqua* no presentan diferencias en su composición bioquímica en $\mu\text{g individuo}^{-1}$ (Tabla V.19). Por el contrario, *S. marginatus* difiere en su contenido en proteínas y lípidos en los ovocitos con *E. siliqua*, mientras con *E. arcuatus* sólo lo hace en los lípidos. Los ovocitos de *S. marginatus* presentan una composición similar a la de los pectínidos *Crassadoma gigantea* y *Patinopecten yessoensis* (Whyte *et al.*, 1990a, 1991). Sin embargo, las composiciones de los ovocitos

en estas especies de *Ensis* son similares a los del mejillón *M. galloprovincialis* (Sedano, 1992).

Tabla V.19. Composición de lípidos y proteínas de ovocitos y larvas D de algunos bivalvos expresados como ng de componente por individuo.

| Especie | Lípidos (ng ind. ⁻¹) | | Proteínas (ng ind. ⁻¹) | | Autores |
|--------------------------------|----------------------------------|---------|------------------------------------|---------|-------------------------------|
| | Ovocito | Larva D | Ovocito | Larva D | |
| <i>Ensis arcuatus</i> | 11,17 | 21,46 | 44,14 | 26,60 | Presente estudio |
| <i>E. siliqua</i> | 13,21 | 22,27 | 36,12 | 35,24 | Presente estudio |
| <i>Solen marginatus</i> | 37,24 | 37,15 | 77,52 | 65,71 | Presente estudio |
| <i>Cerastoderma edule</i> | 11 | - | - | - | Honkoop <i>et al.</i> (1999) |
| <i>Macoma balthica</i> | 78 | - | - | - | Honkoop <i>et al.</i> (1999) |
| <i>Mytilus edulis</i> | 16 | - | - | - | Honkoop <i>et al.</i> (1999) |
| <i>M. galloprovincialis</i> | 12,20 | 7,07 | 29,17 | 22,57 | Sedano (1992) |
| <i>Crassostrea virginica</i> | 9,2-4,3 | 4,1-0,3 | - | - | Gallager <i>et al.</i> (1986) |
| <i>Mercenaria mercenaria</i> | 8,0-2,3 | 4,0-2,8 | - | - | Gallager <i>et al.</i> (1986) |
| <i>Crassadoma gigantea</i> | 27,75 | 12,06 | 53,12 | 24,57 | Whyte <i>et al.</i> (1990a) |
| <i>Patinopecten yessoensis</i> | 28,14 | 14,36 | 52,20 | 27,80 | Whyte <i>et al.</i> (1991) |
| <i>Argopecten purpuratus</i> | 5,1 | 6,3 | 5,9 | 11,3 | Farías <i>et al.</i> (1998) |

Se ha postulado en diversas investigaciones que las dimensiones de los ovocitos son importantes cuando se intenta discernir entre las estrategias reproductivas entre grandes tipos de desarrollos. Un primer tipo sería la estrategia lecitotrófica - con huevos grandes (>90 μm de diámetro) que contienen grandes cantidades de lípidos para alimentar el desarrollo, y la planctotrófica - huevos pequeños (40-90 μm), conteniendo pequeñas cantidades de lípidos y alimentándose en el plancton (Thorson, 1946; Ockelmann, 1965). Por lo tanto, en base a investigaciones de este tipo se puede plantear encuadrar la estrategia de cada especie en uno de estos dos tipos, aún sin considerarlos desde un punto de vista cerrado. Así, *E. arcuatus* se englobaría dentro del desarrollo planctotrófico, al presentar un diámetro ovocitario inferior a 90 μm . En el caso de *E. siliqua* sus ovocitos miden poco más de 90 μm . Siguiendo lo citado por estos autores, a *S. marginatus*, con un tamaño de 140-150 μm , le correspondería un desarrollo de tipo lecitotrófico. A la vista de los resultados experimentales obtenidos, las larvas de *S. marginatus* necesitan alimentarse a lo largo del desarrollo larvario para crecer y superar la metamorfosis (observación personal). Las larvas de esta especie sometidas a ayuno pueden aguantar vivas hasta 8-9 días, observándose al final de este período movilidad de las larvas y el consumo de reservas en la glándula digestiva. La especie de la familia Semelidae *Scrobicularia plana* posee un ovocito similar al de *S. marginatus*, con un diámetro de 75-80 μm el ovocito se encuentra rodeado por una envuelta coriónica de un total de 140-150 μm (Frenkiel & Mouëza, 1979). Esta especie necesita alimentarse para

alcanzar la metamorfosis y fijación, teniendo un desarrollo larvario de tipo planctotrófico. Lo mismo sucede en la familia Tellinidae, en la que *Macoma balthica* con ovocitos de entre 100 y 110 μm y un gran almacén de lípidos, posee un desarrollo planctotrófico (Honkoop *et al.*, 1999).

Comparando los ovocitos y larvas de las tres especies, desde un punto de vista bioquímico, se pueden establecer diferencias entre los comportamientos de las especies. Las composiciones de proteínas y en segundo lugar de lípidos, al ser los componentes que juegan un papel más importante en la bioquímica de las larvas, son las que presentan más diferencias.

La mayoría de los autores, investigando con distintas especies de bivalvos, citan los lípidos como la principal fuente energética durante la embriogénesis en invertebrados marinos (Tabla V.18). Así, Gallager *et al.* (1986) señalan una pérdida del 69% y el 71% de los lípidos totales durante la embriogénesis del venérido *Mercenaria mercenaria* y el ostreído *Crassostrea virginica*, respectivamente. Estos autores demostraron que los lípidos endógenos proporcionados en los ovocitos por los progenitores durante la vitelogénesis son rápidamente metabolizados durante la embriogénesis antes del desarrollo de un mecanismo funcional para la alimentación. En el desarrollo embrionario del mitílido *Mytilus galloprovincialis*, la contribución energética de proteínas, lípidos y glúcidos es del 42%, 55% y 3%, respectivamente (Sedano, 1992). Por lo tanto, los lípidos son la principal fuente energética en el desarrollo embrionario de esta especie. En el pectínido *Patinopecten magellanicus* se produce un descenso del 52% de las reservas de triglicéridos durante la embriogénesis (de huevo a 4 días) y del 32% durante el desarrollo larvario temprano (de 4 a 8 días) (Pernet *et al.*, 2003). Así, a pesar de que la larva se alimenta exógenamente de fitoplancton desde el día 4, los triglicéridos continúan descendiendo hasta el día 8. Sin embargo, estos autores no encontraron diferencias significativas en el contenido de lípidos totales entre el huevo y las larvas de 4 y 8 días.

Whyte *et al.* (1990a, 1991) citan que, en los pectínidos *Crassadoma gigantea* y *Patinopecten yessoensis*, la embriogénesis se sustenta casi por igual por los lípidos (47-48%) y proteínas (43-45%), y en menor medida por los glúcidos (10-7%). Aunque sólo el 9,8% del total de energía esperada que se origina por los carbohidratos en

C. gigantea, sobre el 80% se catabolizó siendo así la reserva más usada (Whyte *et al.*, 1990a). Los ovocitos del pectínido *Argopecten purpuratus* presentan valores elevados de lípidos y proteínas, mientras el glucógeno es muy bajo (Farías *et al.*, 1998). Las larvas de *A. purpuratus* muestran un incremento en proteínas y carbohidratos y un descenso de los lípidos durante las primeras 48 horas del desarrollo, y después hay un incremento gradual de todos los componentes, con los lípidos y las proteínas aumentando en mayor medida que los carbohidratos (Farías *et al.*, 1998).

Por el contrario, la estrategia bioquímica seguida en las tres especies estudiadas en este trabajo es muy distinta a las anteriormente descritas en otras especies, siendo la fuente principal de energía las proteínas, con diferencias entre las especies (Tabla V.19).

En *Ensis arcuatus* para superar la embriogénesis se usan las proteínas, con un descenso del 39,7%, lo que conlleva un aumento de los lípidos. El balance energético en esta transición supone en *E. arcuatus* una reducción del 48,9% de energía expresado en kcal g⁻¹.

En *E. siliqua* hay una reducción menor, sólo descende la cantidad de proteínas en 2,4%. Debido a este menor descenso, y al producirse un aumento similar en los lípidos (40,7% frente a 47,9% en *E. arcuatus*), el balance energético de las larvas D es 14,8% menor que en el ovocito.

Los ovocitos de *S. marginatus* presentan mayor contenido en lípidos y proteínas que las dos especies de *Ensis*, y si se comparan con otras especies, estos contenidos en *S. marginatus* son bastante elevados. Tanto en proteínas como en lípidos se producen descensos, con 15,2% y 0,3%, respectivamente. Esto contrasta con el comportamiento de las dos especies de *Ensis*, en las que los lípidos expresados por individuo aumentan significativamente. Además, en *S. marginatus* el balance energético de ovocito a larva D sale positivo, ganando energía por valor del 2,8%.

Parece contradictorio que un proceso como la embriogénesis, considerado como lecitotrófico desde el punto de vista nutricional, en el que el embrión no puede alimentarse del medio externo sino que lo hace a partir de las reservas almacenadas en

el ovocito y que le han transmitido los parentales, se produzcan ganancias de energía como la que se produce en *S. marginatus*.

Una posible explicación es la propuesta por Manahan & Crisp (1982), que indican que la materia orgánica disuelta (MOD) puede ser captada por diferentes formas larvarias de invertebrados marinos. Las larvas de los ostreidos *Ostrea edulis*, *Crassostrea gigas* y el mitilido *Mytilus edulis*, son capaces de captar aminoácidos disueltos en el agua de mar a través de la superficie del velo (Manahan & Crisp, 1983). Manahan (1983) comprueba que los embriones de la ostra *C. gigas* pueden captar glicina marcada y que la activación de este mecanismo coincide con la primera división celular tras la fecundación. Asimismo, la tasa de captación aumenta progresivamente con el tiempo.

Todo ello es utilizado por Sedano (1992) para explicar cómo, desde la fase de gástrula ciliada hasta larva D veliger en el mitilido *Mytilus galloprovincialis*, se produce una recuperación en la materia orgánica, principalmente debida al aumento de los fosfolípidos y proteínas, además de mantenerse los lípidos neutros y glúcidos. Esta fase es la segunda fase de la embriogénesis en la que se produce la organogénesis y que se van formando las distintas estructuras larvarias hasta que se forma el velo y comienza la secreción de la concha o prodisoconcha I presente en la larva D veliger.

En el pectínido *Argopecten purpuratus* también se produce, desde la fertilización hasta las 48 horas posteriores, un aumento de proteínas y glúcidos principalmente (Fariás *et al.*, 1998). En esta especie se produce un ligero aumento en los lípidos expresados como cantidad por individuo, pero un descenso en porcentaje. Estos autores lo explican como una adsorción de MOD por parte de los embriones de esta especie (Manahan, 1990).

Otra explicación se desprende de lo observado en el pectínido *Placopecten magellanicus*, en el que en el paso de ovocito a larva de 4 y 8 días no existen diferencias significativas en el contenido total de lípidos, mientras sí descienden significativamente los triglicéridos y aumentan significativamente los ácidos grasos libres, el colesterol, los lípidos polares con grupos acetona móviles y los fosfolípidos (Pernet *et al.*, 2003). Esto mismo sucede en *S. marginatus*, especie en la que durante el paso de ovocito a larva D

no hay diferencias significativas en los lípidos totales, mientras, separando los ácidos grasos en lípidos neutros y polares, sí que hay disminuciones significativas en ambos grupos. Podría haber alguna clase lipídica aumentando en esta transición que enmascare la evolución de los lípidos totales durante el desarrollo embrionario.

Con el estudio en el capítulo siguiente de los ácidos grasos separados en familias de lípidos neutros (función energética) y polares (función estructural, principalmente en las membranas), se podrá ver cómo varían estas dos familias, pudiendo ver si se produce un acumulo y/o utilización preferencial de alguna de ellas del ovocito hasta la larva D. Así, un incremento de los lípidos polares sería normal puesto que, aumenta el número de células y membranas a lo largo de la embriología y se producen gran cantidad de estructuras nuevas, como el velo. Si se produce aumento de los lípidos neutros, éste estaría causado por el acumulo de energía procedente de algún otro sustrato bioquímico en forma de lípidos de reserva.

Por lo tanto se hace necesario un estudio más detallado de los cambios bioquímicos que se producen a lo largo de la embriología de estas especies hasta alcanzar la larva D veliger.

La especie de tellínido *Macoma balthica* posee unos ovocitos de una talla entre 100-110 μm y una reserva lipídica de 78 ng ind.⁻¹, que se corresponde un 32,5% de lípidos expresado como porcentaje del peso seco libre de cenizas (Honkoop *et al.*, 1999). Esta reserva de lípidos es muy elevada, incluso si se compara con la cantidad almacenada por *S. marginatus* (37,24 ng ind.⁻¹), que tiene un diámetro de ovocito de 140-150 μm , aunque la presencia de corión aumenta el tamaño del huevo. Los citados autores aluden a que *M. balthica* es la especie que primero desova en su área, a principios de primavera. Las posibles ventajas de ello serían: 1. evitar la competencia por el alimento, y 2. evitar una alta presión predatoria por parte del zooplancton. Las desventajas serían: 1. las relativas bajas temperaturas del agua al principio de la primavera, por lo que el crecimiento larvario sería lento, y 2. la baja disponibilidad de alimento para las larvas. Por todo ello, se sugiere que almacena esas ricas reservas lipídicas.

En nuestro caso *S. marginatus* tiene ovocitos de gran tamaño y gran acumulo lipídico encapsulado en una envuelta coriónica para poder proteger sus ovocitos en un ambiente fluctuante y con condiciones extremas (deshidratación, condiciones anóxicas del sedimento, etc.), como es el interior de las rías. Además, las reservas almacenadas permitirían llevar a cabo un desarrollo larvario muy corto y así, poder alcanzar las fases bentónicas en el menor tiempo posible, exponiéndose menos a los depredadores. Según Frenkiel & Mouëza (1979) en su trabajo con la especie de la familia Semelidae *Scrobicularia plana*, la protección de los primeros estadios del desarrollo puede ser una adaptación ecológica a cambios de presión osmótica o a la contaminación. Raleigh & Keegan (2007) trabajando también con *S. plana*, le atribuyen a la envuelta coriónica una función de barrera protectora ante las infecciones bacterianas, reduciendo la tasa de infección en las etapas tempranas del desarrollo.

Por su parte, *E. arcuatus* desova entre enero y abril, cuando la temperatura del agua es baja, y además es la que presenta el desarrollo larvario más largo (20 días a $19\pm 1^{\circ}\text{C}$). Si se cultiva a una temperatura de 14°C se alcanza la fijación en 26 días (da Costa *et al.*, 2006). Sin embargo, no sigue la misma estrategia que el tellínido *M. balthica*, ya que no almacena muchos lípidos, y su ovocito es de menor tamaño. Los adultos de *E. arcuatus* presentan varios picos de Índice de Condición Gonadal, con lo que desovarán varias veces, produciendo distintas cohortes a medida que avanza la época de puesta y mejoran las condiciones ambientales (aumento de la temperatura del agua y del fitoplancton disponible). Al final, todo ello permite que tengan toda la primavera y verano para crecer, lo que podría permitir que se igualasen las tallas de las primeras y últimas puestas.

El período larvario en *E. siliqua* dura 14 días a $19\pm 1^{\circ}\text{C}$, con lo que sería una estrategia diferente a las dos especies citadas anteriormente, con una duración del desarrollo larvario intermedia entre las dos. El desarrollo larvario de *E. siliqua* es 7 días más corto que el de *E. arcuatus*, pero sin embargo no se encuentran diferencias significativas en el contenido bioquímico de los ovocitos. Por lo tanto, las larvas de *E. siliqua* deberían mantener un metabolismo más elevado que las de *E. arcuatus*, que les permitiría crecer más rápido y alcanzar antes la metamorfosis y superarla, partiendo del mismo contenido de reservas energéticas en los ovocitos.

Además del estudio de los distintos componentes bioquímicos y sus evoluciones en las distintas fases, es importante ver su relación con parámetros de cultivo importantes tales como el crecimiento y la supervivencia en distintas fases. La calidad de los ovocitos es un factor importante que influencia la supervivencia de las larvas y su desarrollo.

Gallager *et al.* (1986) sugieren que altas supervivencias deben ir acompañadas de un alto contenido de lípidos pero ésto no necesariamente garantiza una buena supervivencia. Los niveles altos de lípidos no siempre son deseables en el desarrollo de las larvas. Elston *et al.* (1981) encontraron vacuolas lipídicas anormalmente largas depositadas en el estómago, saco del estilo, glándula digestiva y tejidos intestinales en la progresión temprana de la enfermedad larvaria, vibriosis.

En el estudio de Bayne *et al.* (1975), los lípidos de los huevos de mejillón sin fertilizar se correlacionan directamente con el desarrollo larvario temprano, pero no se correlacionan con el crecimiento de larvas tardías, una vez que se inició la alimentación. Tampoco se encontró una correlación significativa entre el contenido de lípidos del día 1 y la consiguiente supervivencia.

En el pectínido *Pecten maximus* el éxito en la eclosión está determinado en función de las reservas de lípidos de los ovocitos (Devauchelle & Mingant, 1991). Para la misma especie, Le Pennec *et al.* (1990) encontraron también una relación fuerte entre el índice de lípidos, el éxito de la eclosión, y el número de larvas anormales tras dos días de cultivo. Pero no encontraron relación entre este índice y la supervivencia o crecimiento de las larvas. Por el contrario, en la especie de la misma familia *Placopecten magellanicus* la composición lipídica de la gónada femenina y de los ovocitos no son capaces de predecir el desove (número y tamaño de los ovocitos) ni los rendimientos larvarios (supervivencia y crecimiento) (Pernet *et al.*, 2003).

Como antes se menciona, la mayoría de los autores se centran en los lípidos en el estudio de la bioquímica de los desarrollos larvarios, aunque en este estudio se puede apreciar la importancia de los tres componentes estudiados, pero con comportamientos distintos entre las especies.

En *E. arcuatus* un mayor contenido de lípidos, proteínas y glúcidos en los ovocitos influye positivamente en la supervivencia en la fijación, siendo sólo los glúcidos relevantes en la supervivencia de las larvas D. El que para las larvas D sólo influyan los glúcidos puede ser debido a que es quizá la energía directamente disponible. Además el contenido total por individuo de los lípidos en las larvas D veliger es importante tanto en la supervivencia de las larvas D como en la metamorfosis.

En *E. siliqua* las cantidades de glúcidos en los ovocitos se correlacionan negativamente con la supervivencia en las larvas D. Esta correlación negativa en los glúcidos no llega a afectar a la supervivencia en la fijación, siendo por lo tanto un contenido elevado de glúcidos no deseable para lograr buenas supervivencias en la larva D. Además, muestra la importancia de estos componentes en el desarrollo larvario.

Sin embargo, el aumento del porcentaje de las proteínas en los ovocitos de *E. siliqua* conduce a un aumento en la supervivencia en la fijación, mostrando además de la importancia del contenido proteico en los ovocitos, la importancia de un adecuado balance entre los distintos componentes.

La estrategia difiere un poco en *S. marginatus*, en la que sí hay una relación entre las cantidades totales de lípidos, proteínas y glúcidos en la supervivencia en la etapa de larva D y cuándo se produce la metamorfosis, de tal modo que, al aumentar las cantidades de componentes bioquímicos, desciende la supervivencia. En *S. marginatus* sucede lo mismo que en *E. siliqua* con el porcentaje de proteínas en ovocitos, pero afecta a la supervivencia de larvas D y en la fijación.

En las larvas D de *S. marginatus* si aumentan las cantidades de estos tres componentes bioquímicos, se produce un descenso en las supervivencias de larvas D y postlarvas.

Las diferencias entre las tres especies se acentúan en las proteínas en las larvas D veliger, siendo por tanto, el componente bioquímico que puede explicar en esta fase las diferencias entre las tres especies. En segundo lugar los lípidos explicarían las diferencias de las dos especies de *Ensis* con *S. marginatus*.

Posteriormente al descenso de las reservas energéticas presentes en el ovocito, hay una fase que ha denominado Lucas *et al.* (1986) período "mixotrófico", en la que la energía obtenida del alimento por la larva es insuficiente para soportar las demandas metabólicas que suponen el crecimiento de la prodisoconcha II y el aumento del peso del cuerpo, necesitando la larva utilizar las reservas vitelinas.

Al comenzar a alimentarse la larva D en *E. arcuatus* va creciendo, manteniendo hasta los 8 días las proteínas, pero se puede observar un descenso en los lípidos y glúcidos en porcentaje frente al peso seco total y también, si se expresa como la energía por gramo. Lo mismo sucede hasta los 8 días en *E. siliqua*, fase que se corresponde en esta especie con la pediveliger y en *S. marginatus* a los 5 días (pediveliger), a excepción de los glúcidos que aumentan. Estos descensos no son apreciables si expresamos cada constituyente en cantidad por individuo.

A partir de esta fase comienzan a almacenarse e incrementarse todos los constituyentes a lo largo de lo que queda de desarrollo, hasta los momentos previos a la metamorfosis.

La metamorfosis, la transición de larvas a juveniles, es la segunda etapa del desarrollo que recae sobre reservas almacenadas debido a la desintegración del velo, que limita la locomoción e inhibe la alimentación (Hodgson & Burke, 1988). Las reservas de energía en la larva premetamórfica dependen en último lugar del valor nutricional de las dietas microalgales de la larva en desarrollo (Whyte *et al.*, 1989, 1990b).

La viabilidad de las larvas está limitada por la acumulación y/o utilización de sustratos energéticos, como lípidos (Millard & Scott, 1967; Helm *et al.*, 1973; Holland & Spencer, 1973) o proteínas (Barlett, 1979; Rodríguez *et al.*, 1990), pero no carbohidratos (Collyer, 1957; Holland & Spencer, 1973; Barlett, 1979; Gallagher & Mann, 1986; Gallagher *et al.*, 1986). Pero a pesar de ello, Haws *et al.* (1993) mantiene que los carbohidratos deben jugar un papel en la óptima utilización de otras reservas. La hipótesis implicada en todos estos estudios es que la viabilidad de las larvas de bivalvos está determinada por la capacidad de las larvas para acumular suficientes reservas que permitan mantener la demanda energética durante el proceso del desarrollo.

Cuando el animal lleva a cabo el proceso de la metamorfosis, va a estar particularmente afectado por un déficit energético que pone en peligro su supervivencia. Así, ésta va a depender de la habilidad para completar nuevas estructuras, incluida la formación de la concha, mientras tanto, ésto se lleva a cabo con las reservas acumuladas antes de la metamorfosis.

De acuerdo con Haws *et al.* (1993), el éxito de la metamorfosis no se debe a la acumulación de suficientes reservas de un único sustrato para cubrir las necesidades energéticas de la metamorfosis. De hecho, la supervivencia debe depender de la habilidad para movilizar varios tipos de sustratos para varios procesos anabólicos y catabólicos del organismo.

En varias larvas de invertebrados, los lípidos han demostrado ser el principal componente bioquímico movilizado cuando existe una alteración energética. Es posible que los lípidos sean una fuente importante de energía durante los períodos de estrés, y el índice de lípidos pueda ser útil para determinar la condición fisiológica de las larvas de bivalvos (Gallager *et al.*, 1986). El papel principal de los lípidos como fuente de energía, principalmente los triglicéridos, es el suministro de energía para el crecimiento de las larvas de bivalvos y la metamorfosis (Holland & Spencer, 1973; Napolitano *et al.*, 1992), mientras que después de la metamorfosis la energía para un crecimiento normal en los juveniles y adultos de los bivalvos, está suministrada por el glucógeno (Holland & Hannant, 1974).

El papel de las proteínas debe ser reinterpretado en el contexto de un proceso fisiológico de extrema importancia durante la metamorfosis: la formación de la concha. Este proceso crea una demanda de energía para transportar iones al lugar donde tiene lugar la mineralización, así como sintetizar y segregar los polímeros orgánicos (principalmente proteínas) usados para unir los minerales a la matriz de la concha (Whyte *et al.*, 1990b). Wilbur & Saleuddin (1983), no dan datos exactos de la energía necesaria para el transporte de iones basando su estimación en el contenido orgánico de la concha, y sugieren que cerca del 33% del total de energía usada para crecimiento es necesaria para la formación de la concha.

La teoría de la formación de la concha debería explicar el destino de al menos parte del contenido de proteínas, en vez de ser una contribución en energía, puede verse como una contribución estructural al proceso de formación de la concha, en el cual la alta tasa de crecimiento (medido en términos de peso inorgánico o longitud) que hay en períodos de metamorfosis y postmetamorfosis, coincide con una alta tasa de catabolismo de proteínas.

Tanto en *E. arcuatus*, *E. siliqua* como en *S. marginatus* no se produce acumulación selectiva de ninguno de los componentes bioquímicos, ni se utilizan preferentemente en la metamorfosis. Ésto ocurre también en el mitílido *M. galloprovincialis* en cuyas larvas no se produce acumulación selectiva de ninguno de los componentes a lo largo del desarrollo larvario (Sedano, 1992). Las proteínas, más que los lípidos neutros, son las reservas energéticas de las larvas del ostreido *C. gigas* al final del desarrollo, cuando aparece la pediveliger (Barlett, 1979), aunque durante la metamorfosis ningún componente se utiliza preferentemente sobre los demás. Labarta *et al.* (1999) encontraron en la ostra europea *O. edulis* que los lípidos son la principal fuente de energía metabólica a lo largo del desarrollo larvario en esta especie, aunque también encontraron una tasa de catabolismo de proteínas significativa. Sin embargo, en *O. edulis* hay autores que citan descensos en los lípidos durante la metamorfosis (Holland & Spencer, 1973) mientras otros citan descensos en las proteínas (His & Maurer, 1988; Rodríguez *et al.*, 1990).

Todo lo expuesto hace suponer que la estrategia de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus* consiste en utilizar las proteínas en el desarrollo embrionario y a lo largo del desarrollo larvario, desde larva D hasta la metamorfosis, acumular indistintamente reservas energéticas para superar la metamorfosis.



VI. Capítulo IV: Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

VI.1.- INTRODUCCIÓN

VI.1.1.- Lípidos y ácidos grasos: definición y clasificación

Los lípidos son por excelencia moléculas biológicas multifuncionales, utilizadas tanto como elementos estructurales de membrana (fosfolípidos y esteroides), conectores que permiten la inserción en membrana de ciertas proteínas, o como metabolitos particularmente ricos en energía (cuando se trata de ácidos grasos o de triacilglicerol). También, son los precursores inmediatos de un gran número de mensajeros intra y extracelulares (eicosanoides, diacilglicerol, fosfoinositoides y esteroides).

Según Christie (1982), los lípidos pueden clasificarse por su composición química y estructural en: **simples o neutros** y **complejos o polares**.

1- Simples o neutros: constituidos por uno o dos tipos de compuestos generalmente neutros, diferenciando los siguientes:

✓ **Acilglicerol:** formados por monoacilglicerol (=monoglicérido), di y tri (=di y triglicérido). Poseen 1 molécula de glicerol unida a 1, 2 ó 3 ácidos grasos mediante enlaces éster (Fig. VI.1). Están presentes en grasas y aceites de origen animal o vegetal.

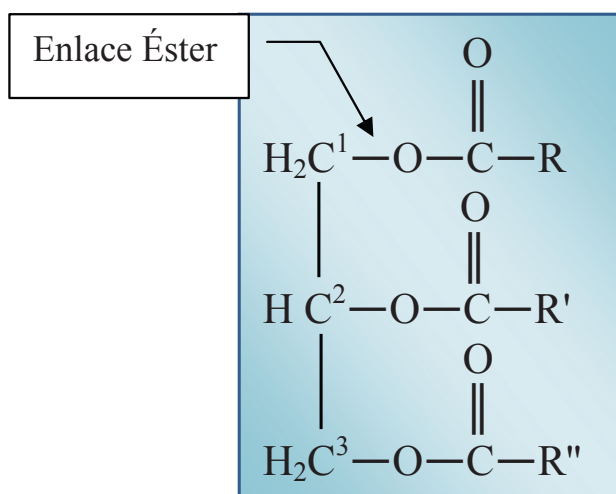


Fig. VI.1. Estructura de los acilglicerol.

✓ **Alquildiacilglicerol y alquenildiacilglicerol**: análogos a los triglicéridos, pero con un enlace éter de tipo alquílico o vinílico.

✓ **Esterol**: son moléculas con un sistema anular tetracíclico. Poseen un grupo hidroxilo en posición 2, pudiendo encontrarse esterificado dando lugar a los éster derivados. El colesterol libre se encuentra en las membranas.

✓ **Ésteres de ceras**: cadena carbonada larga de un alcohol más cadena larga de un ácido graso unidas con enlace éster.

✓ **Tocoferol**: aparecen en aceites vegetales.

✓ **Ácidos grasos libres**

2- Complejos o polares: contienen tres o más identidades químicas, alguna de las cuales les confiere características polares. Se diferencian tres grupos principales:

✓ **Fosfoglicéridos (=glicerofosfolípidos o fosfoacilglicerol)**: uno de los tres componentes mayoritarios de las membranas, junto con el colesterol libre y los fosfoesfingolípidos. Como se observa en la figura VI.2, tienen una estructura similar a un acilglicerol, diferenciándose en que, en posición 3 del glicerol, presentan una cadena polar unida mediante un grupo fosfato con un enlace fosfodiéster.

✓ **Plasmalógenos polares**: con un enlace éter de tipo alquílico o vinílico.

✓ **Glicerolípidos**: (=glicolípidos): son diacilglicerol que en posición 3 del glicerol se unen a una o más moléculas glucídicas (glucosa, galactosa) mediante enlace glucosídico.

✓ **Esfingolípidos**: formados por la esfingosina: cadena alifática larga aminada, con 2 ó 3 grupos hidroxilo (=alcohol aminado) y a menudo con un doble enlace “trans” en posición 4.

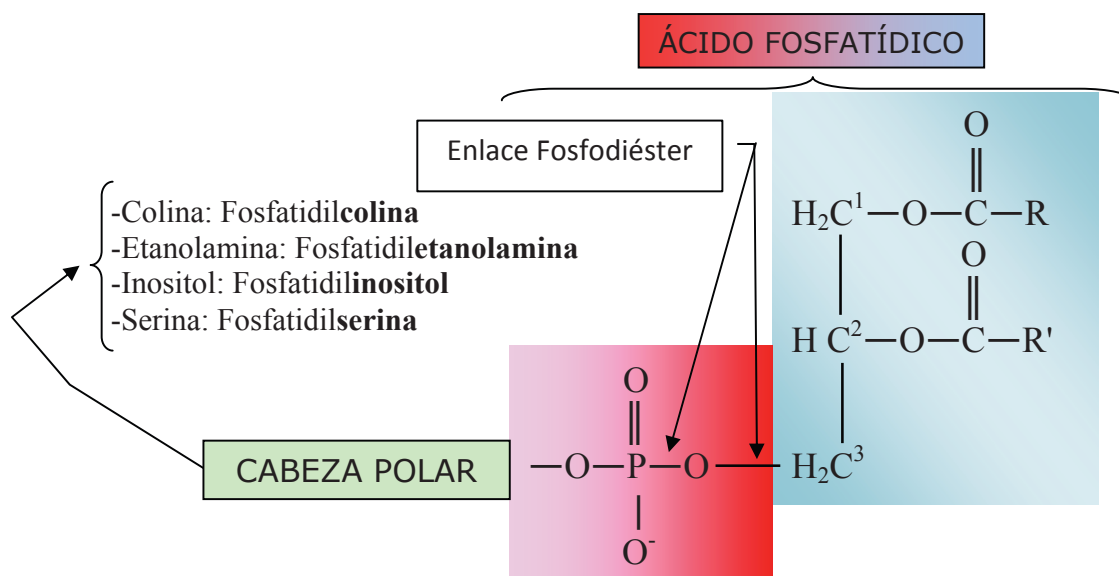


Fig. VI.2. Estructura de un fosfoglicérido.

Se puede hacer otra clasificación de los lípidos de acuerdo con su función fisiológica, dividiéndolos en **lípidos de reserva** (triglicéridos fundamentalmente) y **lípidos estructurales** (siendo los mayoritarios los fosfoglicéridos, los esfingolípidos y el colesterol libre).

Los ácidos grasos son el constituyente primario de la mayoría de los lípidos cuya estructura es una cadena alifática con un grupo funcional carboxilo (Fig. VI.3).

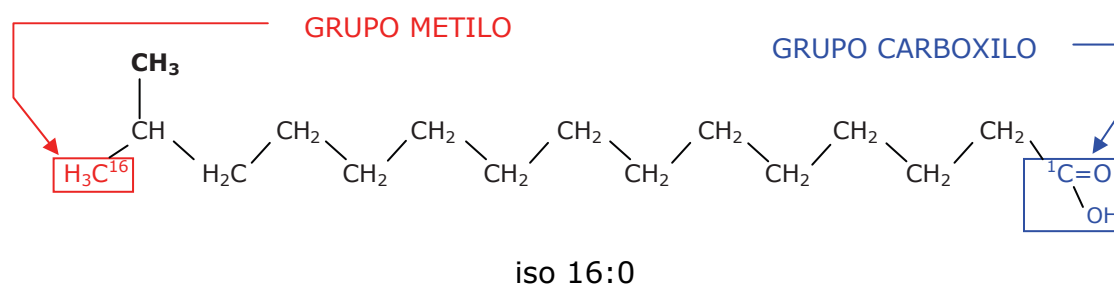
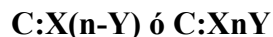


Fig. VI.3. Estructura molecular de un ácido graso.

Nosotros los nombraremos por la fórmula:



C: número de átomos de carbono

X: número de dobles enlaces

Y: carbono del primer doble enlace contado a partir del grupo metilo terminal

Se clasifican en función de la cadena carbonada en:

- ✓ **Ácidos grasos saturados (AGS o SAFAs):** sin dobles enlaces.
- ✓ **Ácidos grasos monoinsaturados (AGMI o MUFAs):** con un doble enlace.
- ✓ **Ácidos grasos poliinsaturados (AGPI o PUFAs):** con dos o más dobles enlaces, pudiéndose dividir en:

- Ácidos grasos con menos de 20 átomos de carbono y con hasta 3 dobles enlaces:

Ácido linoleico (LA): 18:2n6. **E**

Ácido α -linolénico (LNA): 18:3n3. **E**

- Ácidos grasos altamente insaturados (HUFAs): con más de 20 átomos de carbono y más de tres dobles enlaces:

Ácido araquidónico (ARA): 20:4n6. **e**

Ácido eicosapentaenoico (EPA): 20:5n3. **e**

Ácido docosahexaenoico (DHA): 22:6n3. **e**

- Ácidos grasos no-metilén-interrumpidos (AGNMI): son ácidos grasos con dos (o más) centros de insaturación los cuales no (o no todos) son metilén interrumpidos. Los dobles enlaces están separados por más de un grupo metileno.

(**E, e**)= EFAs: ácidos grasos esenciales que no pueden ser biosintetizados por los organismos, debiéndose aportar en la dieta.

En la figura VI.4 se muestra un esquema simplificado de las rutas biosintéticas de los ácidos grasos.

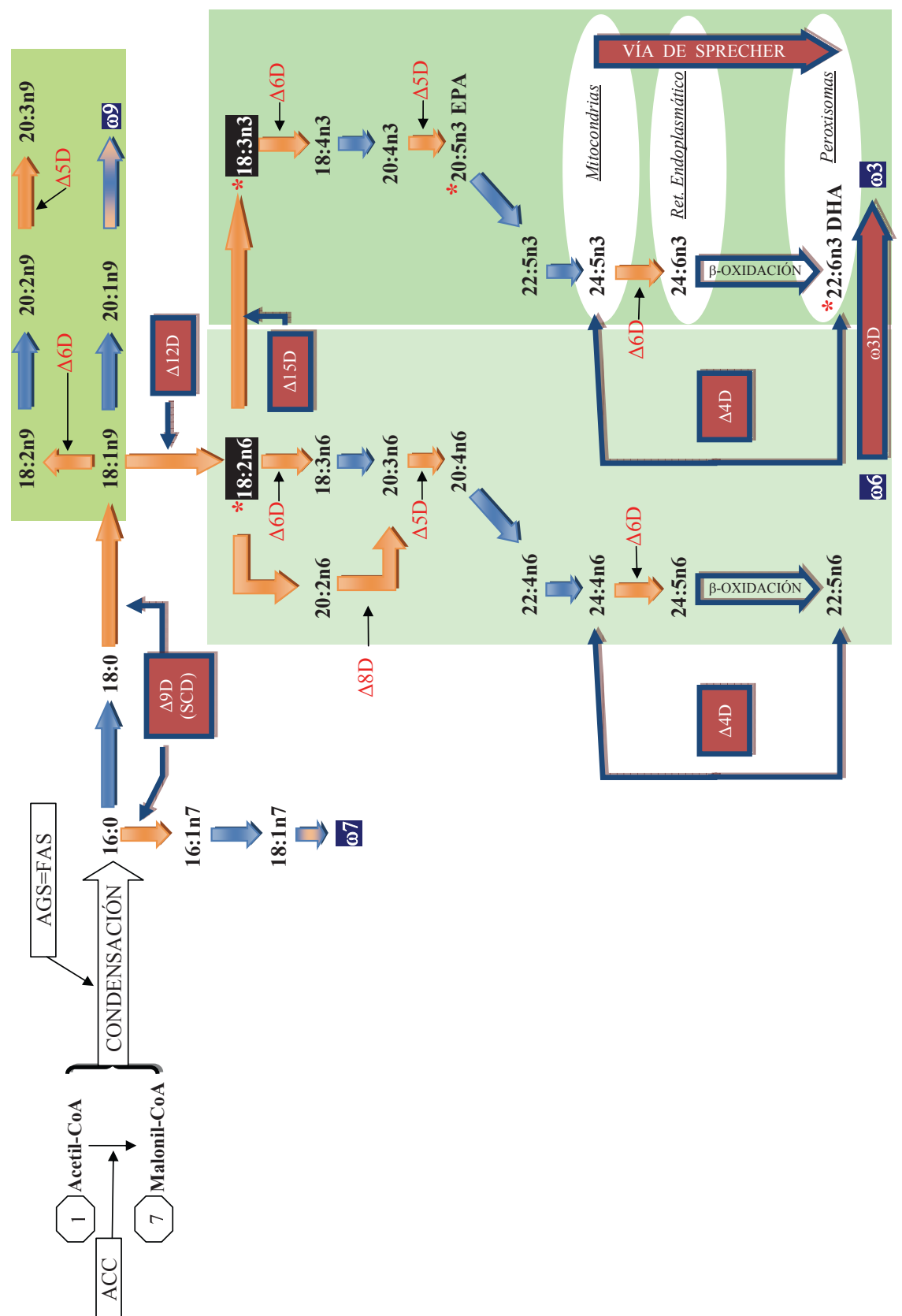


Fig. VI.4. Esquema simplificado de las rutas biosintéticas de ácidos grasos. Las flechas azules representan las elongaciones, las naranjas las desaturaciones y los asteriscos los ácidos grasos esenciales.

VI.1.2.- Los ácidos grasos de las microalgas

En la composición en ácidos grasos de numerosas microalgas se observa una gran variabilidad interespecífica (Ackman *et al.*, 1968; Ben-Amotz *et al.*, 1987; Volkman *et al.*, 1989).

Por otra parte, las diferencias en el crecimiento de larvas y postlarvas de bivalvos se relacionan con estas variaciones en la composición en ácidos grasos de la alimentación. Así, Enright *et al.* (1986b) constatan una relación entre una alimentación limitante en DHA con una disminución en el crecimiento de juveniles de *Ostrea edulis*. Langdon & Waldock (1981) observan el mismo fenómeno al alimentar juveniles de *Crassostrea gigas* con *Dunaliella tertiolecta* (clorofícea), y este descenso de crecimiento, se invertía con dietas suplementadas en DHA o, con extractos lipídicos ricos en EPA y DHA.

VI.1.3.- Los ácidos grasos en el cultivo larvario

La calidad de los huevos es un factor muy importante debido a su influencia en el crecimiento larvario, en la fijación, crecimiento de la semilla y supervivencia de juveniles (Bayne, 1972; Bayne *et al.*, 1982).

Los lípidos se encuentran mayoritariamente en forma de gotículas o sacos de aceite ricos en triglicéridos (fracción principal de los lípidos neutros), constituyendo una parte importante de las reservas del huevo. Esto fue observado por Lee & Heffernan (1991) en la ostra americana *Crassostrea virginica* o en la vieira *Pecten maximus* (Dorange & Le Pennec, 1989).

Los triglicéridos se acumulan en los lípidos de reserva de los ovocitos durante la vitelogénesis, para que a partir de ellos, se obtenga energía durante la embriogénesis (Holland, 1978; Gallagher *et al.*, 1986; Utting & Millican, 1997). Ésta es una fase lecitotrófica, en la que no existe alimentación externa. Posteriormente, cuando la larva D veliger comienza a alimentarse, hay una fase de transición nutricional en la que coexisten una utilización de las reservas endógenas y una alimentación basada en una dieta microalgal exógena. Esta fase se denomina mixotrófica y se trata de un período

crucial durante el cual, los lípidos acumulados inicialmente en el ovocito, y en particular los triglicéridos, se utilizan con fines energéticos (Holland & Spencer, 1973; Langdon & Waldock, 1981; Gallager *et al.*, 1986; Napolitano *et al.*, 1988, 1992; Marty *et al.*, 1992; Delaunay *et al.*, 1993).

Asimismo, los triglicéridos acumulados en las larvas de bivalvos, presentan una doble función a lo largo de la fase planctotrófica o de alimentación externa. Por una parte, los ácidos grasos saturados se almacenan como reserva energética y, por otra, sirven como reserva temporal de ácidos grasos poliinsaturados (AGPI), que pueden ser transferidos a los lípidos polares o dirigidos a vías metabólicas específicas durante la metamorfosis (Napolitano *et al.*, 1989; Coutteau *et al.*, 1996; Caers *et al.*, 1999). Estudios realizados en animales muestran que los ácidos grasos esenciales (EFAs) ácido linoleico (18:2n6) y ácido α -linolénico (18:3n3) procedentes de la dieta, son rápidamente almacenados en triglicéridos del tejido adiposo, actuando éste como un reservorio de EFAs para los procesos lipogénicos (Lin *et al.*, 1993; Matthews *et al.*, 2000).

Consecuentemente, los lípidos neutros no sólo se relacionan con el éxito del desarrollo larvario de bivalvos, medido en términos de crecimiento, sino también de supervivencia (Gallager *et al.*, 1986).

Por otra parte, dentro de los lípidos polares encontramos a los fosfolípidos, que son los constituyentes mayoritarios y están formando parte de todas las membranas biológicas. Además, dentro de los lípidos polares hay ácidos grasos combinados con constituyentes bioquímicos mayoritarios, que juegan un papel importante, como por ejemplo los constituyentes de la yema de huevo. Las lipovitelininas o lipoproteínas de la yema del huevo (actuales HDL), que se aislaron en el bivalvo *Pecten maximus* y el cefalópodo, *Sepia officinalis* (Lee, 1991), forman parte de esta fracción lipídica.

Concretamente, las lipoproteínas del huevo representan el 30-50% de los lípidos totales de huevos de crustáceos, poliquetos y moluscos (Lee *et al.*, 2006). Éstas juegan un papel importante durante el desarrollo embrionario, proporcionando componentes estructurales y precursores metabólicos al no estar consideradas únicamente como fuentes energéticas para el desarrollo embrionario.

De las lipovitelinas, la fosfatidilcolina, parece ser mayoritaria (Lee, 1991) y, el EPA, es el ácido graso que se encuentra en mayor abundancia en el carbono 1 de la fosfatidilcolina, como encontraron en el zooplancton (Alberts *et al.*, 1996).

Es decir, en general los ácidos grasos constituyen una fuente particularmente importante de energía durante el desarrollo embrionario de los moluscos (Pandian, 1969; Gallager *et al.*, 1986; Whyte *et al.*, 1990b). Este papel energético se mantiene durante el desarrollo larvario y postlarvario (Holland & Spencer, 1973; Whyte *et al.*, 1987) y permite la supervivencia de las larvas durante los períodos de débil disponibilidad alimentaria (Helm *et al.*, 1973). Las investigaciones se han orientado hacia el estudio de la calidad de los lípidos de los ovocitos y, en particular, de los AGPI que los bivalvos son incapaces de biosintetizar (De Moreno *et al.*, 1976; Trider & Castell, 1980; Langdon & Waldock, 1981; Waldock & Holland, 1984; Uki *et al.*, 1986; Delaunay *et al.*, 1993). Los AGPI 20:4n6, 20:5n3 y 22:6n3 son considerados como ácidos grasos esenciales para la supervivencia, el crecimiento y la reproducción de las especies marinas (Cowey *et al.*, 1976; Kanazawa *et al.*, 1979; Trider & Castell, 1980; Uki *et al.*, 1986).

La presencia en algunos moluscos bivalvos de ácidos grasos de 20 y 22 carbonos no-metilén-interrumpidos (AGNMI) con dobles enlaces, planteó en un principio su posible origen trófico (Paradis & Ackman, 1977). Posteriormente, se demostró que ciertos bivalvos son capaces de sintetizarlos “*de novo*” a partir de los ácidos grasos monoinsaturados (AGMI), como el 16:1n7 y 18:1n9, a través de varias elongaciones y por la acción de una $\Delta 5$ desaturasa (Zhukova, 1986, 1991). Los AGNMI, parecen ser más importantes en adultos y larvas de mitílidos y ostreidos que en pectínidos, donde su contenido se considera traza o inexistente (Joseph, 1982; Whyte, 1988; Zhukova, 1991; Marty *et al.*, 1992; Soudant, 1995; Pazos *et al.*, 1996; Soudant *et al.*, 1999; Freitas *et al.*, 2002). Su función en los organismos marinos es desconocida, aunque su biosíntesis se ha relacionado con una deficiencia de ácidos grasos esenciales, como el 20:4n6 (Klingensmith, 1982; Whyte, 1988; Abad *et al.*, 1995). En algunos bivalvos están en altos niveles durante períodos de ayuno y se acumulan preferentemente en la fracción polar, sugiriendo una función a nivel estructural o una resistencia a la degradación (Joseph, 1982; Klingensmith, 1982; Thompson & Harrison, 1992).

Según todo esto, los ácidos grasos aportados en la alimentación suministrada a los progenitores en el criadero, van a repercutir en la composición de las reservas lipídicas de los ovocitos que se liberen en la puesta y por consiguiente, en el éxito de la embriogénesis y posterior desarrollo larvario. Así, las necesidades de crecimiento y formación de biomembranas serán resueltas a partir del funcionamiento de las rutas lipogénicas que tengan lugar en estos estadios tempranos de alimentación lecitotrófica y mixotrófica. Pero, también son esenciales en la fase planctotrófica o de alimentación externa.

VI.2.- OBJETIVOS

El objetivo de este capítulo es estudiar la composición de ácidos grasos en los lípidos neutros (función energética) y polares (función estructural) a lo largo del desarrollo larvario en las tres especies. Conocido el patrón de comportamiento en cada especie se establecieron comparaciones tanto a nivel de estrategia, como enfrentando los estadios de ovocito, larva D, pediveliger y postlarva recién fijada entre las distintas especies.

VI.3.- MATERIAL Y MÉTODOS

VI.3.1.- Recogida de muestras y tratamiento

- **Microalgas**

Se analizaron al azar muestras de 6 cultivos por duplicado de la mezcla de fitoplancton utilizada como alimento, consistente en las siguientes especies: *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* y *Chaetoceros calcitrans*. Una vez conocida la concentración de la mezcla de microalgas, se usó un volumen de entre 5 y 15 ml.

- **Ovocitos y larvas**

Se han recogido para los análisis de ácidos grasos los estadios que se citan en el apartado III.2.5.1. En total se han seguido 3 desarrollos por duplicado de *Ensis arcuatus* y *E. siliqua*, y 2 desarrollos por duplicado de *Solen marginatus*.

- **Tratamiento de las muestras**

Las muestras se recogieron en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/F de 4,5 cm de diámetro, previamente horneados a 450°C durante 24 horas. Se lavaron las sales con formiato amónico al 3%, se transfirieron a tubos de vidrio a los que se añadieron 6 ml de cloroformo-metanol (2:1 v/v) y se almacenaron a -20°C, previo burbujeo con nitrógeno.

VI.3.2.- Análisis de ácidos grasos

Una alícuota de las muestras de microalgas y larvas almacenadas en cloroformo-metanol (2:1, v/v), se sometió al protocolo de determinación y cuantificación de los ácidos grasos descrito por Marty *et al.* (1992) (Esquema VI.1).

Los reactivos utilizados fueron: gel de sílice 60, Merck®; boro-trifluoruro-metanol (solución al 15%), Merck®; disulfuro de carbono (CS₂), Merck®; metanol y cloroformo para cromatografía en fase líquida (HPLC), Merck®; n-hexano LiChrosolv

para cromatografía en fase líquida (HPLC), Merck[®]; 2-propanol gradient grade para cromatografía en fase líquida (HPLC), Merck[®].

Como estándares fueron empleados: una mezcla de 37 ácidos grasos metilados, Sigma[®] 189-19 y como patrón interno el ácido tricosanoico (C23:0), Sigma[®] T-6543.

En el caso de las muestras de fitoplancton, los ácidos grasos se determinaron de los lípidos totales, por lo que no se lleva a cabo la primera etapa de Cromatografía de Adsorción para la separación de las fracciones neutra y polar (LN y LP).

- **Cromatografía SPE (Solid phase extractive)**

En esta fase se emplearon solventes de distinta polaridad (cloroformo-metanol al 2% y metanol) para extraer en un soporte sólido los componentes de la muestra (lípidos). De esta forma, se retiraron fraccionalmente los lípidos neutros (triglicéridos y esteroides) y posteriormente, los lípidos polares (fosfolípidos) (Esquema VI.1).

Se siguió el método descrito por Marty *et al.* (1992) usando como soporte sólido una pipeta Pasteur rellena de gel de sílice (35 x 5 mm), previamente incinerada a 450°C (24 horas) e hidratada al 6% con agua ultrapura.

- **Metilación**

Los ácidos grasos por su polaridad, poseen un elevado punto de ebullición y lenta elución y no se pueden inyectar directamente al cromatógrafo, por lo que deben ser esterificados. La esterificación les proporciona un grupo metilo que les confiere una menor polaridad y una mayor volatilidad.

Por lo tanto, las muestras debieron ser transesterificadas previamente, para obtener los ésteres metílicos de los ácidos grasos. La transesterificación se hizo con trifluoruro de boro-metanol (15%) durante 10 minutos en baño a 100°C (Metcalf & Schmitz, 1961) (Esquema VI.1).

Una vez esterificados, se extrajeron con disulfuro de carbono, de acuerdo al método descrito por Marty *et al.* (1992) (Esquema VI.1).

- **Purificación de las muestras con HPLC**

La purificación de los ácidos grasos esterificados se realizó según el método utilizado por Soudant (1995) y modificado en nuestro laboratorio. Para ello se utilizó un HPLC Agilent 1100 Series con una bomba cuaternaria de gradientes y un detector UV, equipado con colector automático de muestras. Se utilizaron dos columnas en línea en el siguiente orden, primero LiChrosorb DIOL (5 μ m, 25 cm x 0,4 cm I.D., Merck®) y LiChrospher Si100 (5 μ m, 25 cm x 0,4 cm I.D., Merck®). Como fase móvil se usó una mezcla binaria compuesta por un solvente A (n-hexano) y un solvente B (n-hexano: isopropanol (9:1)) en un gradiente de porcentajes comenzando por 99% de n-hexano.

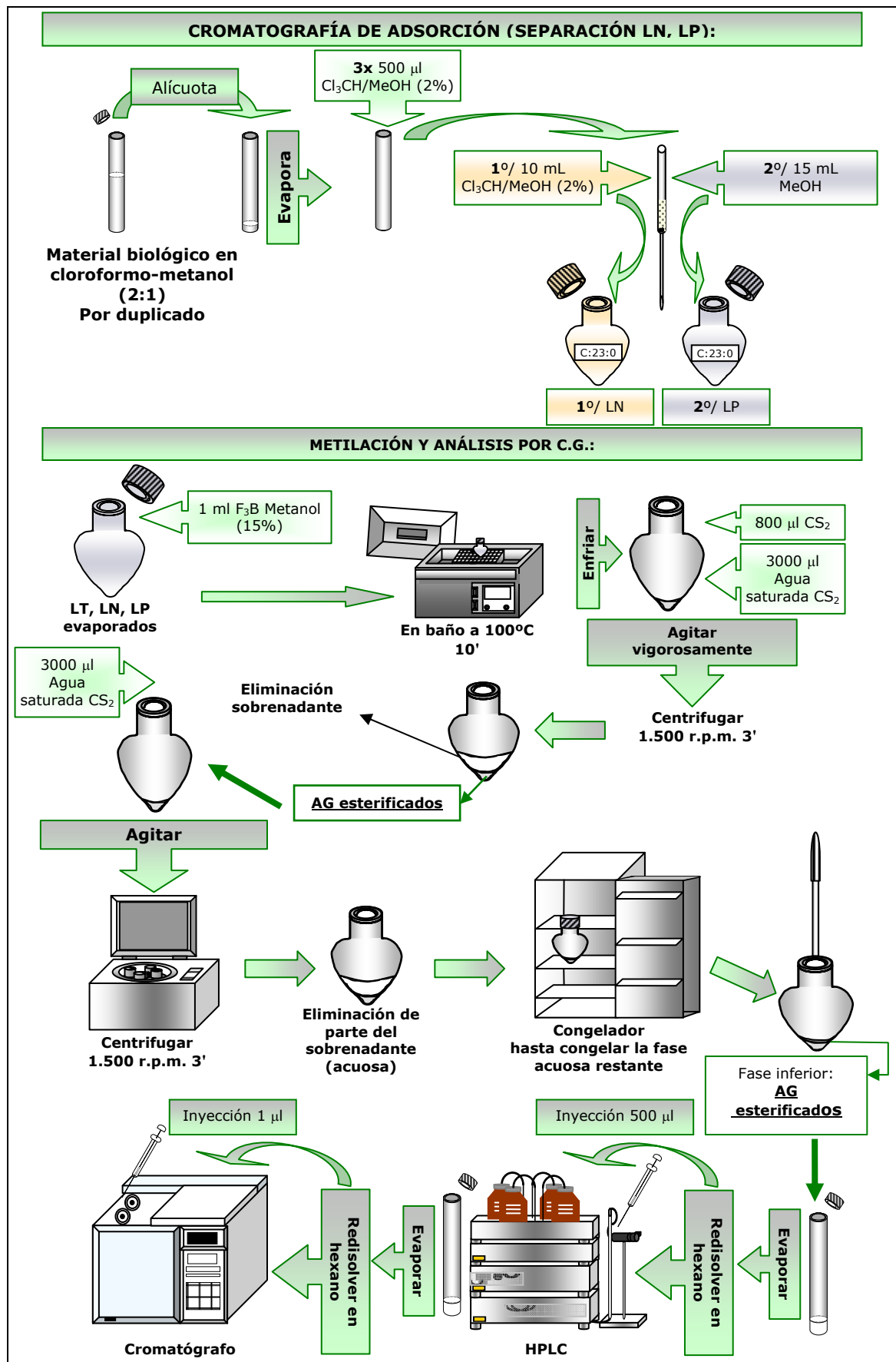
- **Análisis por cromatografía en fase gaseosa**

La fase orgánica obtenida, que contiene los ácidos grasos esterificados, se evaporó bajo flujo constante de nitrógeno. Se resuspendió en un volumen conocido de hexano y se inyectó 1 μ l en el cromatógrafo de gases.

Los ésteres metílicos de los ácidos grasos obtenidos se analizaron en un cromatógrafo de gases Hewlett Packard GC System, equipado con un inyector tipo “cool on column” y un detector de ionización de llama (FID). Las características del método analítico fueron:

- ✓ Temperatura del inyector: 63°C.
- ✓ Separación de los ácidos grasos con una columna capilar de gel de sílice fundido, JW SCIEN (30 m x 0,25 μ m x 250 μ m Ø interno). Dicha columna consta de una fase estacionaria de tipo polar ligada, constituida por polietilen glicol, cuyas temperaturas límites de trabajo están comprendidas entre 50 y 260°C.
- ✓ Como gas portador se empleó el hidrógeno a un flujo de 1,5 ml/min.
- ✓ Con una rampa de temperatura descrita en la figura VI.5.
- ✓ Temperatura del detector: 250°C.

Esquema VI.1. Separación en familias de lípidos neutros y polares, metilación y análisis de ácidos grasos.



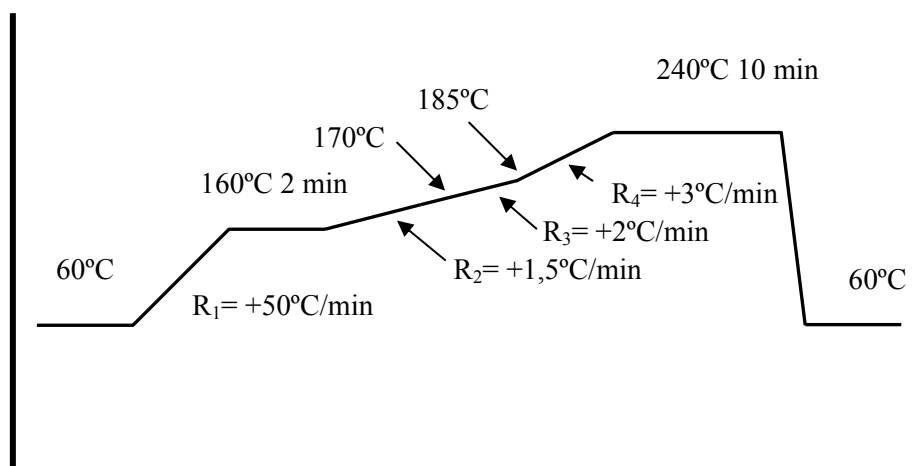


Fig. VI.5. Rampa de temperatura del horno.

Los picos obtenidos se identificaron comparando sus tiempos de retención con un patrón estándar (Sigma[®] 189-19), consistente en una mezcla de 37 ácidos grasos metilados. Además, se utilizaron extractos lipídicos de tres microalgas utilizadas habitualmente como fuente nutritiva en desarrollos larvarios de bivalvos marinos (*Pavlova lutheri*, *Skeletonema costatum* e *Isochrysis aff. galbana*, clon *T-Iso*), cuyas composiciones en ácidos grasos son conocidas (Delaunay, 1992), para la identificación de otros ácidos grasos no presentes en el patrón.

La cuantificación de los distintos ácidos grasos se hace mediante la construcción de rectas de calibración del patrón estándar. Se determinaron a partir de la inyección por triplicado de 50, 100 y 200 ng de dicho patrón diluido en hexano.

Además, se utilizó un patrón interno que fue el ácido tricosanoico (C23:0), que no se encuentra presente en los organismos marinos. Se añade una cantidad conocida de C23:0 a todas las muestras, permitiendo conocer y corregir posibles pérdidas.

Por último, la reproducibilidad cromatográfica en las condiciones analíticas utilizadas es en torno a un 90% para un microgramo de muestra, debiéndose esta diferencia (10%), a las manipulaciones debidas al procesado en el que se incluyen la esterificación de las muestras y la inyección manual de las mismas. Si además se tienen en cuenta las pérdidas debidas a los procesos de extracción de lípidos neutros y polares la reproducibilidad baja al 80%.

- **Principales ácidos grasos identificados**

Los principales ácidos grasos identificados por el método empleado, se exponen en la tabla VI.1, apareciendo su espectro representado en el cromatograma de la figura VI.6. En los resultados se exponen los ácidos grasos mayoritarios.

Tabla VI.1. Principales ácidos grasos identificados y separados.

| Fórmula abreviada | Nomenclatura química | Nombre común |
|--------------------|--|-----------------------------|
| 12:0 | Ác. dodecanoico | Ác. láurico |
| 13:0 | Ác. tridecanoico | |
| 14:0 | Ác. tetradecanoico | Ác. mirístico |
| 15:0 | Ác. pentadecanoico | |
| 16:0 | Ác. hexadecanoico | Ác. palmítico |
| 17:0 | Ác. heptadecanoico | Ác. margárico |
| 18:0 | Ác. octadecanoico | Ác. esteárico |
| 19:0 | Ác. nonadecanoico | |
| 23:0 | Ác.tricosanoico | |
| 16:0 dma | Ác. Hexadecanoico dimetil acetal | |
| 17:0 dma | Ác. Heptadecanoico dimetil acetal | |
| 18:0 dma | Ác. Octadecanoico dimetil acetal | |
| 16:1n5 | Ác. 11-hexadecenoico | |
| 16:1n7 | Ác. 9-hexadecenoico | |
| 16:1n9 | Ác. 7-hexadecenoico | Ác. palmitoleico |
| 18:1n7 | Ác. 11-octadecenoico | Ác. vaccénico |
| 18:1n9 | Ác. 9-octadecenoico | Ác. oleico |
| 20:1n7 | Ác. 13-eicosenoico | |
| 20:1n9 | Ác. 11-eicosenoico | |
| 20:1n11 | Ác. 9-eicosenoico | |
| 18:2n6 | Ác. 9,12-octadecadienoico | Ác. linoleico |
| 18:3n3 | Ác. 9,12,15-octadecatrienoico | Ác. α -linolénico |
| 18:3n6 | Ác. 6,9,12-octadecatrienoico | Ác. γ -linolénico |
| 18:4n3 | Ác. 6,9,12,15-octadecatetraenoico | |
| 21:4n6 | Ác. 6,9,12,15-heneicosatetraenoico | |
| 21:5n3 | Ác. 6,9,12,15,18-heneicosapentaenoico | |
| 20:2n6 | Ác. 11,14-eicosadienoico | |
| 20:3n3 | Ác. 11,14,17-eicosatrienoico | Ác. homogamma linolénico |
| 20:3n6 | Ác. 8,11,14-eicosatrienoico | Ác. dihomo linolénico |
| 20:4n6 | Ác. 5,8,11,14-eicosatetraenoico | Ác. araquidónico (ARA) |
| 20:5n3 | Ác. 5,8,11,14,17-eicosapentaenoico | Ác. eicosapentaenoico (EPA) |
| 22:4n6 | Ác. 7,10,13,16-docosatetraenoico | |
| 22:5n6 | Ác. 4,7,10,13,16-docosapentaenoico | Ác. docosapentaenoico |
| 22:5n3 | Ác. 7,10,13,16,19-docosapentaenoico | Ác. clupanodoico |
| 22:6n3 | Ác. 4,7,10,13,16,19-docosahexaenoico | Ác. docosahexaenoico (DHA) |
| 20:2i [20:2(5,11)] | Ácido graso no saturado no-metilén-interrumpido NMIFAS | |
| 20:2j [20:2(5,13)] | Ácido graso no saturado no-metilén-interrumpido NMIFAS | |
| 22:2i [22:2(7,13)] | Ácido graso no saturado no-metilén-interrumpido NMIFAS | |
| 22:2j [22:2(7,15)] | Ácido graso no saturado no-metilén-interrumpido NMIFAS | |

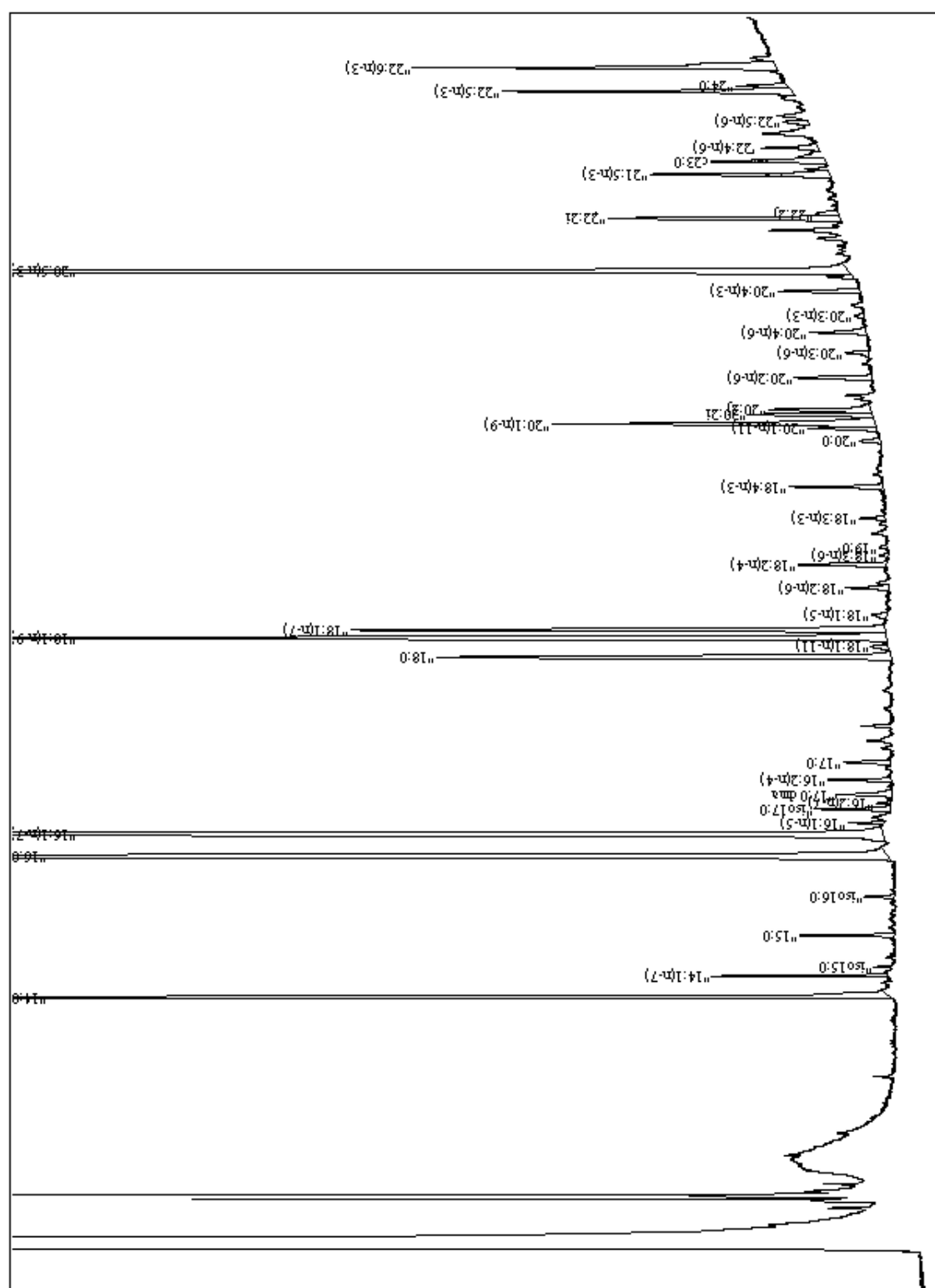


Fig. VI.6. Cromatograma obtenido tras la separación en cromatógrafo de gases de los ácidos grasos esterificados.

VI.3.3.- Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando el paquete estadístico SPSS para Windows versión 13.0. En todas las comparaciones de medias de los ácidos grasos estudiados en un mismo estadio entre especies, se intentó agrupar los datos en los siguientes grupos: ovocito, larva D, pediveliger y postlarva.

La comparación de medias se realizó con tests no paramétricos debido: al tamaño muestral, al incumplimiento por parte de algunos grupos de datos de la distribución normal y no presentaron homogeneidad de varianzas. Para el contraste de más de dos muestras se aplicó el test H de Kruskal-Wallis y para el contraste dos a dos se aplicó el test de contraste de dos muestras independientes U de Mann-Whitney.

Para la comparación de los porcentajes de ácidos grasos entre estadios y entre especies, los valores fueron transformados con una función arcoseno, para evitar trabajar con porcentajes (Sokal & Rohlf, 1995). Una vez transformados los datos, las medias se compararon con el test no paramétrico U de Mann-Whitney.

VI.4.- RESULTADOS

VI.4.1.- Composición de la mezcla del fitoplancton usada como alimento

La composición de las familias de ácidos grasos saturados (AGS), monoinsaturados (AGMI) y poliinsaturados (AGPI) fue del 41, 26 y 38%, respectivamente (Tabla VI.2). Dentro de los AGS, el principal ácido graso fue el palmítico (16:0), con el 19% del total de ácidos grasos, y el ácido mirístico (14:0), con el 17% del total.

Tabla VI.2. Composición de ácidos grasos totales en la mezcla de fitoplancton administrada como alimento a las larvas (*T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri* y *C. calcitrans*). Valores expresados en porcentaje, expresado como media±desviación estándar ($n=6$).

| Ácido graso | Porcentaje (%) |
|-------------|----------------|
| 14:0 | 17,15±2,88 |
| 16:0 | 18,68±1,12 |
| 18:0 | 1,79±0,12 |
| 16:1n7 | 5,62±0,02 |
| 18:1n9 | 14,14±0,30 |
| 18:1n7 | 2,60±0,32 |
| 20:1n11 | 0,45±0,05 |
| 20:1n9 | 0,31±0,00 |
| 20:1n7 | 0,29±0,14 |
| 18:2n6 | 8,01±2,45 |
| 18:3n6 | 0,77±0,38 |
| 18:3n3 | 5,86±0,60 |
| 18:4n3 | 11,68±0,41 |
| 20:2n6 | 0,00±0,00 |
| 20:3n6 | 0,00±0,00 |
| ARA | 0,63±0,02 |
| EPA | 2,30±0,19 |
| 21:4n6 | 0,34±0,01 |
| 21:5n3 | 0,29±0,02 |
| 22:4n6 | 0,31±0,01 |
| 22:5n6 | 0,55±0,11 |
| 22:5n3 | 0,45±0,08 |
| DHA | 5,43±1,18 |
| AGS | 40,62±4,21 |
| AGMI | 25,78±1,72 |
| n9 | 14,19±0,66 |
| n7 | 9,25±0,53 |
| AGPI | 37,56±1,42 |
| n6 | 5,82±0,17 |
| n3 | 29,21±0,67 |
| EPA/ARA | 1,32±0,35 |
| DHA/EPA | 2,42±0,18 |
| n3/n6 | 2,37±0,33 |

Sin embargo, en los AGMI el único ácido graso presente en una cantidad importante fue el ácido oleico (18:1n9), con un 14%, seguido del 16:1n7 con un 7%. En los AGPI el principal fue el 18:4n3 (12%); seguido del ácido linoleico (18:2n6), con 8%; el ácido α -linolénico (18:3n3), con un 6%; el ácido docosaheptaenoico o DHA (22:6n3), con 5% y el ácido eicosapentaenoico o EPA (20:5n3), que representó un 2%.

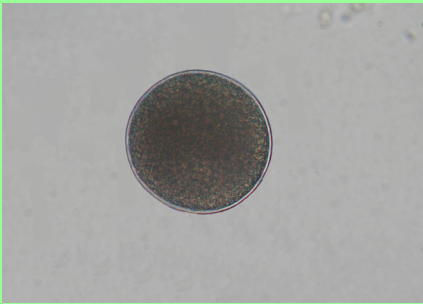
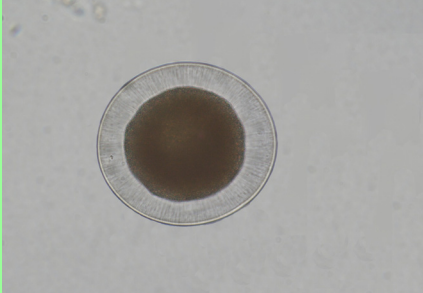
VI.4.2.- Comparativa de los estadios larvarios entre especies

VI.4.2.1.- Ovocito

VI.4.2.1.1.- Lípidos neutros

Los ovocitos de las dos especies de *Ensis* se pueden agrupar en un tipo de ovocito pequeño y de pocas reservas (Fig. VI.7), mientras que el de *S. marginatus*, se caracteriza por tener un gran tamaño y acumular muchas reservas energéticas. Debido a la elevada cantidad de reservas almacenadas en el ovocito de *S. marginatus*, ésta especie supera la metamorfosis con buenas supervivencias. Por el contrario, de las dos especies que presentan un ovocito pequeño y con pocas reservas, sólo *E. arcuatus* tiene unas supervivencias bajas durante el cultivo larvario.

Fig. VI.7. Comparativa de las características generales de los ovocitos de *Solen marginatus* y de las dos especies de *Ensis*.

| | |
|---|---|
|  | Ovocito de las especies de <i>Ensis</i> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Diámetro: 75-90 μm ➤ Peso ovocito 0,14-0,16 $\mu\text{g individuo}^{-1}$, 3-4 veces menor al de <i>Solen</i> ➤ Supervivencia en la fijación elevada en <i>E. siliqua</i> (42%) y baja en <i>E. arcuatus</i> (16%) ➤ Fijación: <i>E. siliqua</i> (15 días) y <i>E. arcuatus</i> (20 días) |
|  | Ovocito de <i>Solen marginatus</i> <ul style="list-style-type: none"> ➤ Presenta envuelta coriónica ➤ Diámetro: 140-150 μm ➤ Peso ovocito 0,55 $\mu\text{g individuo}^{-1}$ ➤ Supervivencia en la fijación elevada (~ 50%) ➤ Fijación: 8-9 días |

VI. Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

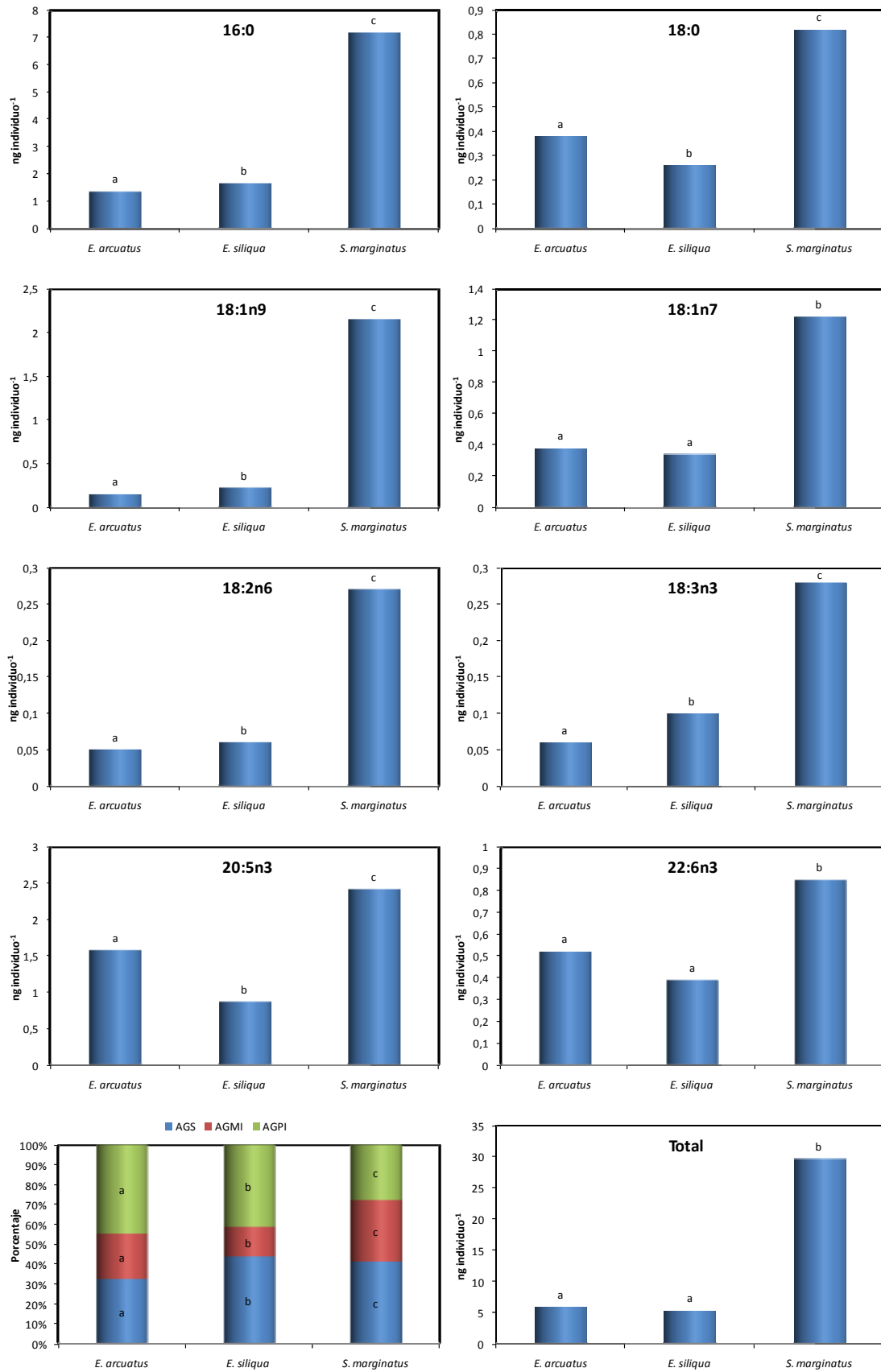


Fig. VI.8. Composición de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros en los ovocitos de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*. Letras distintas indican diferencias significativas al 95% de confianza entre especies (test U de Mann-Whitney).

En los AGS 16:0 y 18:0 y en el AGMI 18:1n9 se observan diferencias significativas entre las tres especies (Fig. VI.8). En el 18:1n7 no hay diferencias en el contenido entre las dos especies de *Ensis*, pero sí con *S. marginatus*.

En los AGPI se puede ver como en el 18:2n6 y 18:3n3 hay diferencias significativas entre las tres especies, con las mayores reservas almacenadas en los ovocitos de *S. marginatus*, seguido por *E. siliqua* y por último, *E. arcuatus*. En el 20:5n3 (EPA) y 22:6n3 (DHA) la especie que presenta contenidos menores es *E. siliqua*, aunque el contenido de DHA es similar al de *E. arcuatus*.

Cada especie presenta preferencialmente un grupo de ácidos grasos. Así, *E. arcuatus* tiene mayor contenido en AGPI, *E. siliqua* almacena en la misma proporción AGS y AGPI y en *S. marginatus* los AGS son mayoritarios, almacenando en igual proporción AGPI y AGMI.

El contenido total de ácidos grasos es similar entre las dos especies de *Ensis* (5 ng ind.⁻¹), mientras que es 6 veces superior en *S. marginatus* (30 ng ind.⁻¹).

VI.4.2.1.2.- Lípidos polares

En las especies de *Ensis* los valores de AGS son similares, pero estadísticamente diferentes (Fig. VI.9). Sin embargo, los valores en *Solen* son superiores a los de *Ensis*, triplicando y cuadruplicando el contenido según los casos.

El oleico (18:1n9) y el 18:1n7 de los AGMI, presentan diferencias en los contenidos en las tres especies, con valores muy elevados en *Solen*.

Los AGPIs representados muestran un comportamiento similar al de los AGMI, con contenidos muy superiores en *Solen* a los de *Ensis*. En el caso del 18:2n6, no se encuentra o lo hace en cantidades traza en las membranas de los ovocitos de *E. arcuatus*.

VI. Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

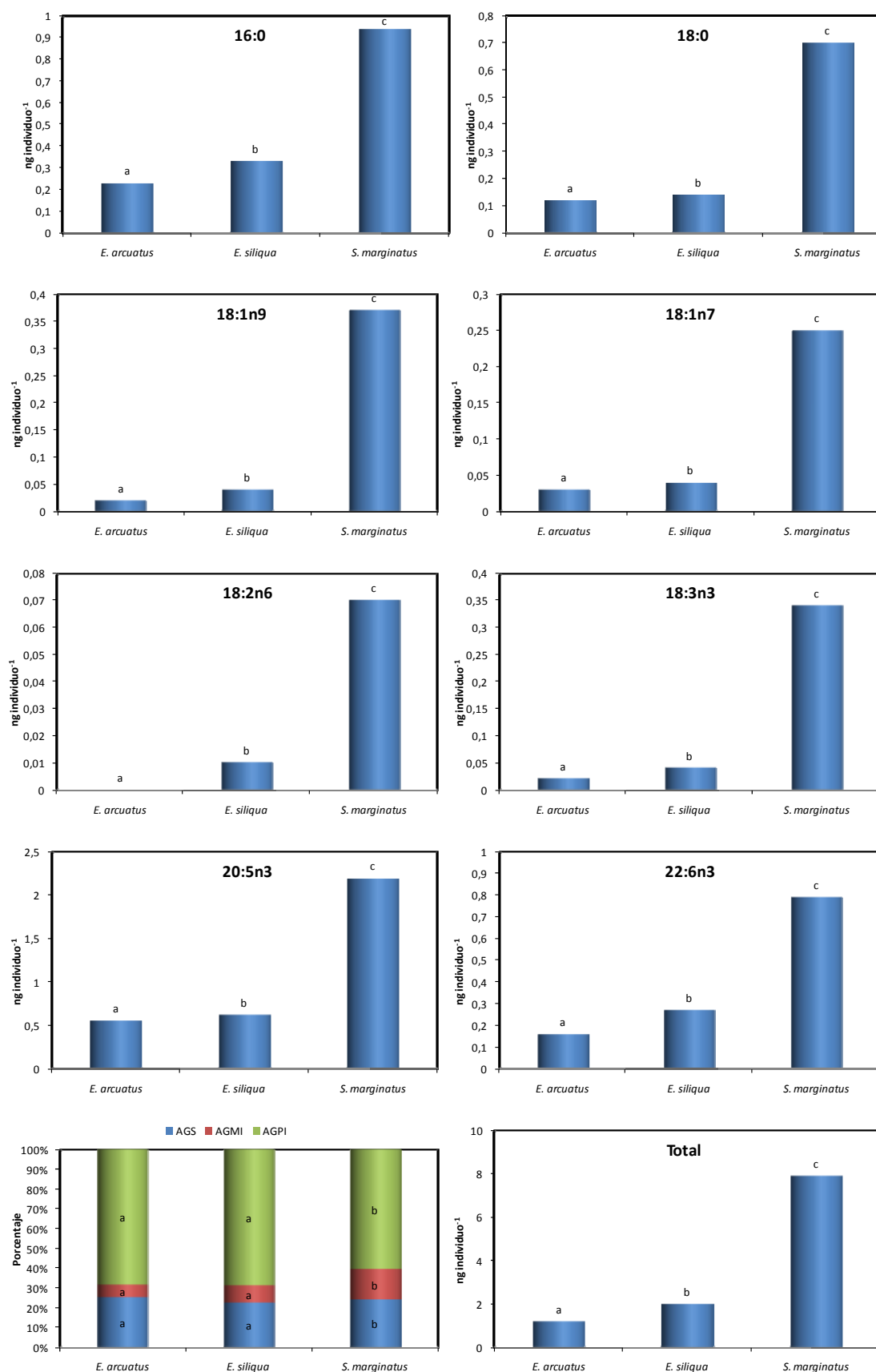


Fig. VI.9. Composición de ácidos grasos en la fracción de lípidos polares en los ovocitos de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*. Letras distintas indican diferencias significativas al 95% de confianza entre especies (test U de Mann-Whitney).

Las cantidades totales de AGS, AGMI y AGPI son dependientes de la especie, así los menores valores están presentes en *E. arcuatus*, seguida de *E. siliqua* y los mayores valores para *S. marginatus*. Si se analizan los datos porcentualmente, se observan valores similares en los AGS, AGMI y AGPI en las dos especies de *Ensis*, que forman un grupo homogéneo, y *S. marginatus* forma otro grupo. Los porcentajes de AGPI son elevados, siendo en todos los casos superiores al 60%.

Lo mismo sucede con el total de ácidos grasos, en el que *S. marginatus* muestra valores que cuadruplican a los de las otras especies, con valores incluso superiores al total en lípidos neutros presentes en *Ensis*.

VI.4.2.2.- Larva D veliger

VI.4.2.2.1.- Lípidos neutros

En la tabla VI.3 se presentan las características más destacables de las larvas D de las tres especies. La talla y el peso seco más elevados se corresponden con las larvas D de *S. marginatus*. En las otras dos especies, se observa cómo *E. siliqua* presenta larvas D con mayor talla, pero menor peso seco que las de *E. arcuatus*.

Tabla VI.3. Días de cultivo, longitud y peso seco de las larvas D veliger de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*.

| | <i>E. arcuatus</i> | <i>E. siliqua</i> | <i>S. marginatus</i> |
|------------------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| Días | 1 | 1 | 1 |
| Longitud (µm) | 117,74-125,26 | 123,09-138,44 | 161,54-170,16 |
| Peso seco (µg ind. ⁻¹) | 0,28-0,43 | 0,18-0,33 | 0,53 |

Las larvas D mantienen el mismo patrón de comportamiento en los lípidos neutros que los ovocitos. Así, las dos especies de *Ensis* tienen pocas reservas acumuladas en los lípidos neutros si se comparan con *S. marginatus*, aunque la diferencia se ha reducido. En los AGS palmítico (16:0) y esteárico (18:0), se puede ver cómo hay diferencias significativas entre las tres especies en los ácidos grasos mayoritarios, presentando valores de mayor a menor en *S. marginatus*, *E. arcuatus* y *E. siliqua* (Fig. VI.10).

Estudiando los AGMI las especies se ordenan del mismo modo en cada ácido graso que en los AGS.

VI. Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

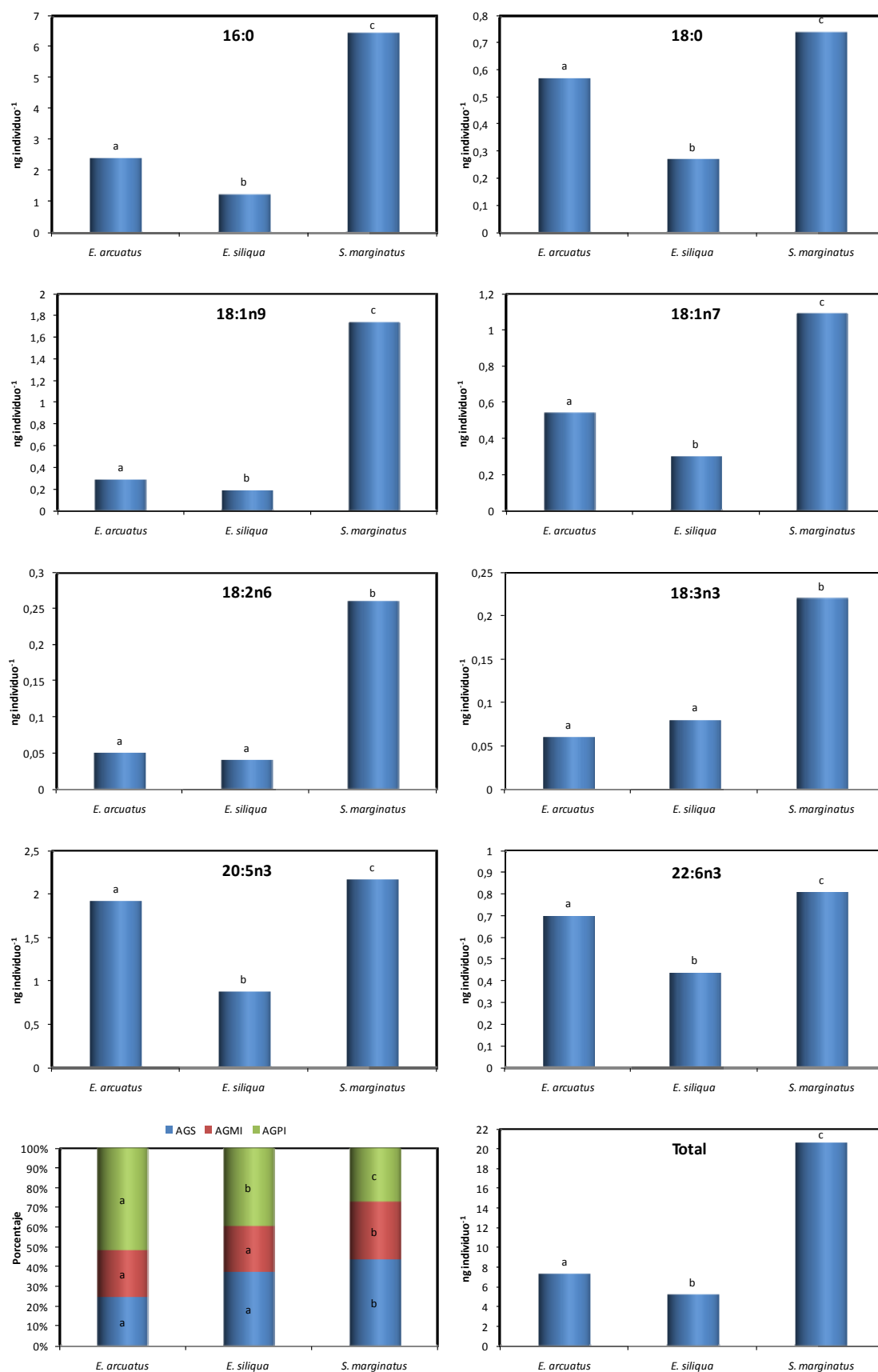


Fig. VI.10. Composición de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros en las larvas D de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*. Letras distintas indican diferencias significativas al 95% de confianza entre especies (test U de Mann-Whitney).

En los AGPI el patrón es el anteriormente mencionado para AGS y AGMI, pero las diferencias en algunos de los ácidos grasos entre *S. marginatus* y *Ensis* son mucho menores. En el caso del 18:2n6 y del 18:3n3, los contenidos en las dos especies de *Ensis* son estadísticamente similares. En el EPA y el DHA, la diferencia entre los contenidos en *E. arcuatus* y *S. marginatus*, es muy pequeña.

En los AGS y AGMI las dos especies de *Ensis* presentan porcentajes similares y *S. marginatus* forma otro grupo. Los porcentajes de AGPI son estadísticamente distintos al 95% de confianza entre las tres especies.

E. siliqua es la especie que contiene una menor cantidad de ácidos grasos totales de las tres, conteniendo *S. marginatus* más del doble de reservas que *Ensis*.

VI.4.2.2.2.- Lípidos polares

En los AGS de los lípidos polares, *S. marginatus* es la especie que acumula mayor cantidad de cada ácido graso, seguido por *E. arcuatus* y por último *E. siliqua*, con diferencias significativas entre las tres especies (Fig. VI.11).

En los AGMI, *S. marginatus* es la especie que acumula mayores cantidades. En el 18:1n7 *Ensis* forma un grupo que se diferencia significativamente de *Solen*. En el ácido oleico (18:1n9) hay diferencias significativas entre las tres especies.

Los AGPI muestran como *S. marginatus* sigue siendo la especie que acumula mayores cantidades en los lípidos polares, pero en este grupo es seguido por *E. siliqua* en vez de por *E. arcuatus* en la mayoría de ácidos grasos, a excepción del 18:3n3 o ácido α -linolénico. En *E. arcuatus* con el 18:2n6 sucede lo mismo que en los ovocitos, no está presente o lo está en cantidades traza en las membranas de la larva D.

VI. Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

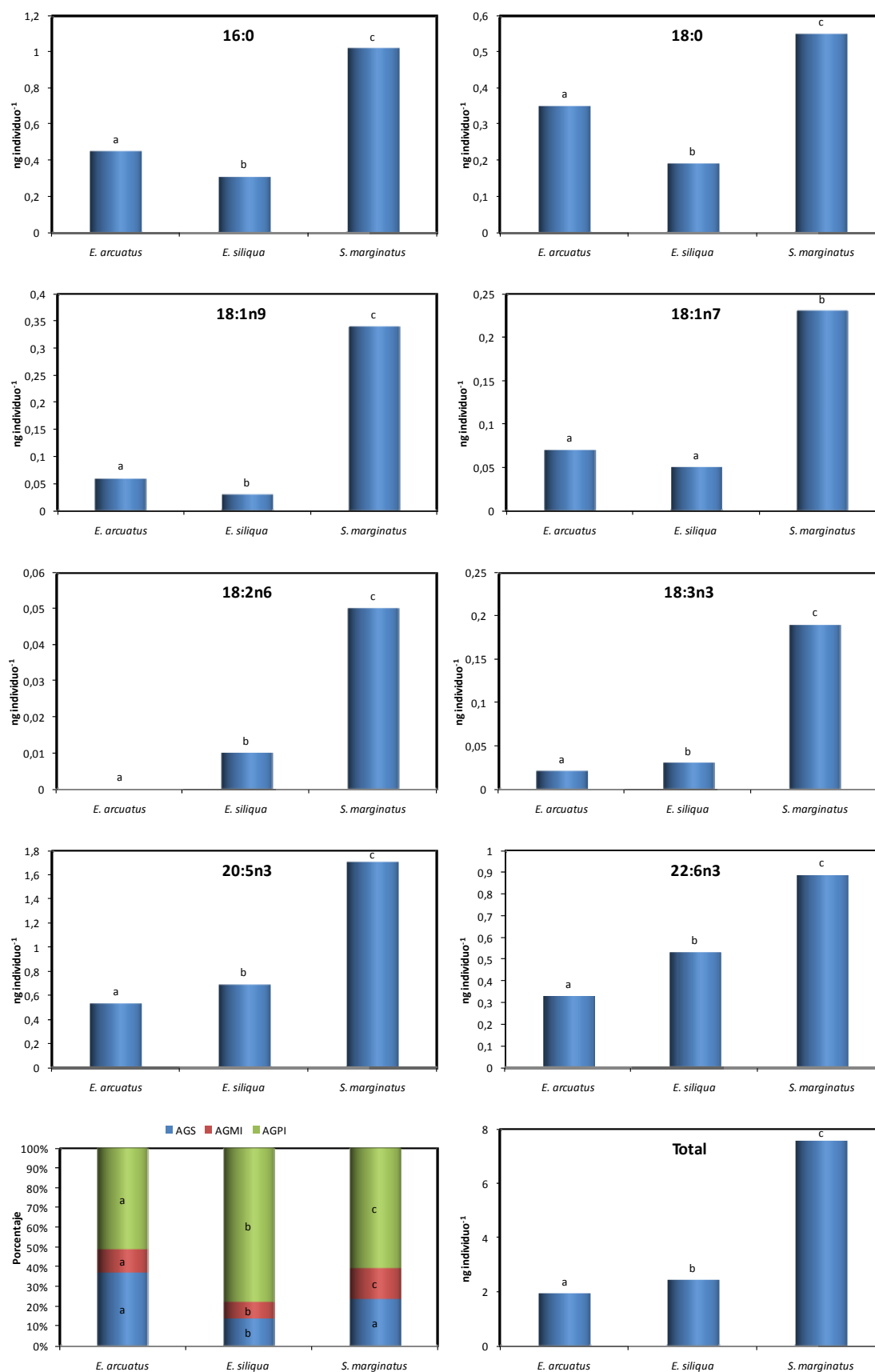


Fig. VI.11. Composición de ácidos grasos en la fracción de lípidos polares en las larvas D de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*. Letras distintas indican diferencias significativas al 95% de confianza entre especies (test U de Mann-Whitney).

En los AGMI, AGPI y ácidos grasos totales hay diferencias significativas entre las tres especies, mientras en los AGS encontramos un grupo formado por *E. arcuatus* y *S. marginatus*, y otro por *E. siliqua*. Las membranas de las larvas D de *E. arcuatus* contienen principalmente AGPI, siendo los AGS relativamente altos. *S. marginatus* y *E. siliqua* presentan principalmente AGPI, siendo en el caso de ésta última especie una proporción mayor.

E. siliqua presenta una cantidad significativamente mayor de lípidos polares que *E. arcuatus*, pero en ambos casos representan aproximadamente un cuarto de la cantidad presente en *S. marginatus*.

VI.4.2.3.- Pediveliger

VI.4.2.3.1.- Lípidos neutros

En la tabla VI.4 se presentan los datos de los días de cultivo, longitud y peso seco de las tres especies estudiadas. Las pediveliger de una talla y peso seco mayor se corresponden con *E. arcuatus*, que tarda 15 días en alcanzar el estadio de pediveliger. El menor peso seco es el de *S. marginatus*, que alcanza el estadio de pediveliger con 5 días, aunque la longitud de la concha es ligeramente superior a la de *E. siliqua*.

Tabla VI.4. Días de cultivo, longitud y peso seco de las pediveliger de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*.

| | <i>E. arcuatus</i> | <i>E. siliqua</i> | <i>S. marginatus</i> |
|------------------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|
| Días | 15 | 8 | 5 |
| Longitud (μm) | 251,41-276,72 | 205,38-237,90 | 219,63-246,55 |
| Peso seco (μg ind. ⁻¹) | 2,47-2,95 | 1,28-1,94 | 1,18-1,44 |

En los AGS de las tres especies el ácido palmítico (16:0) se almacena en cantidades superiores al ácido esteárico (18:0). El contenido en 16:0 es similar entre *E. arcuatus* y *S. marginatus*, mientras en el 18:0 hay diferencias significativas entre las tres especies (Fig. VI.12).

En los AGMI se acumulan principalmente distintos ácidos grasos según la especie, así en *E. arcuatus* se almacena 18:1n7, en *E. siliqua* oleico (18:1n9) y en *S. marginatus* palmitoleico (16:1n7). El contenido en 18:1n9 es similar entre *E. arcuatus* y *E. siliqua*.

VI. Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

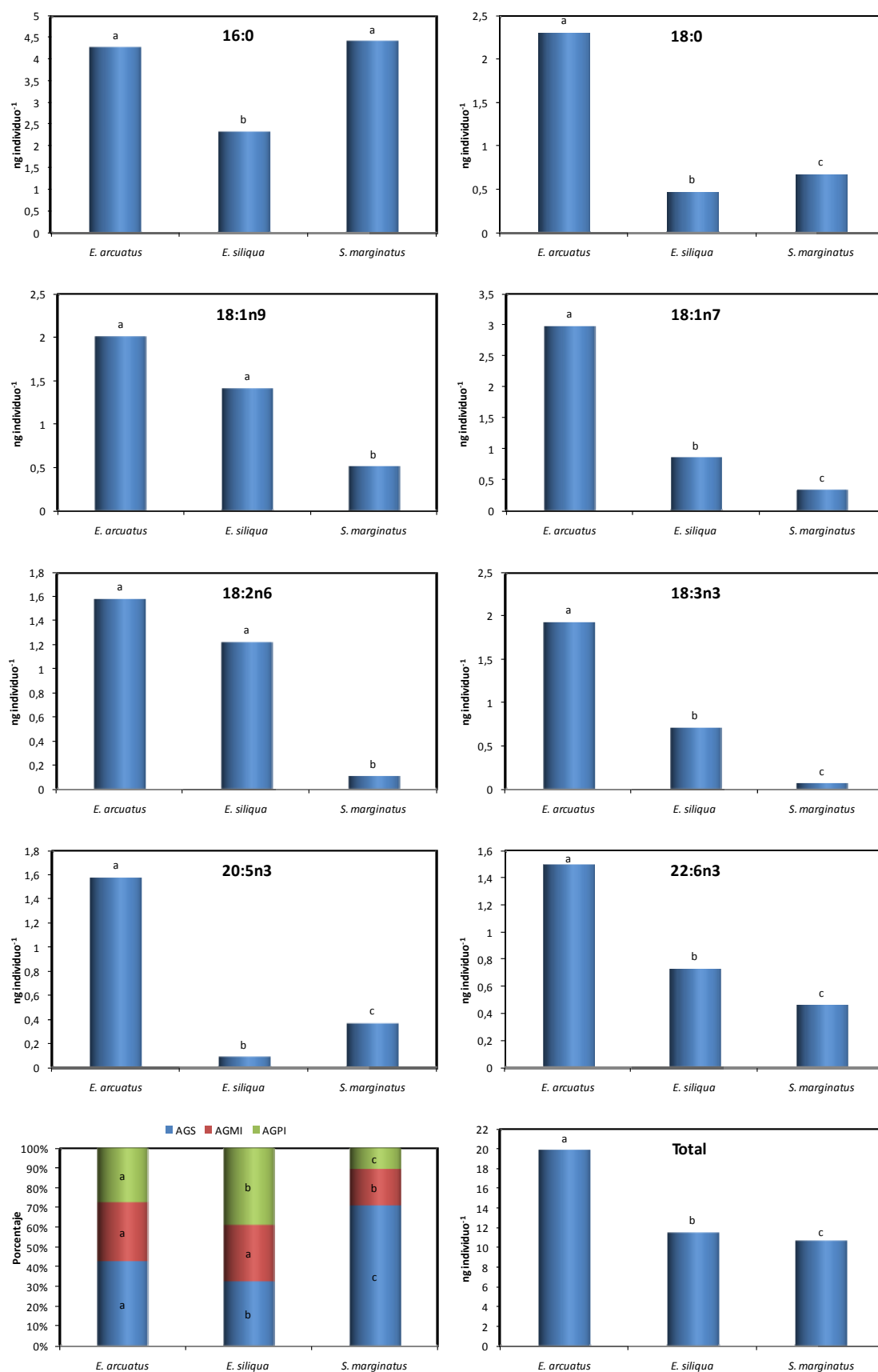


Fig. VI.12. Composición de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros en la pediveliger de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*. Letras distintas indican diferencias significativas al 95% de confianza entre especies (test U de Mann-Whitney).

E. arcuatus es la especie que presenta un contenido mayor en los AGPI representados (18:2n6, 18:3n3, 20:5n3 y 22:6n3). Las dos especies de *Ensis* contienen cantidades estadísticamente similares de 18:2n6. En el EPA el contenido en los lípidos de reserva de *E. arcuatus* es cuatro veces superior al de *S. marginatus*.

La estrategia de almacenamiento de lípidos neutros en la pediveliger en las tres especies es totalmente distinta. Así, *E. arcuatus* y *S. marginatus* acumulan preferentemente AGS, 41 y 70%, respectivamente; y en *E. siliqua* se almacenan AGPI (37%) y AGS (31%).

E. arcuatus es la especie que presenta un mayor almacén en lípidos de reserva, 20 ng individuo⁻¹, doblando el contenido de las otras dos especies.

VI.4.2.3.2.- Lípidos polares

El ácido palmítico (16:0) es el principal AGS de los lípidos polares en las tres especies estudiadas, seguido en contenido por el ácido esteárico (Fig. VI.13). El mayor contenido está presente en *E. arcuatus* con 6,8 ng individuo⁻¹, que representa el 27,6%, mientras las otras dos especies tienen cantidades significativamente menores, que representan entre el 30-31%. En *Ensis* el ácido esteárico (18:0) es el 13-14% del total de ácidos grasos y en *S. marginatus* alcanza un porcentaje aún mayor (25%). Así, en las dos especies de *Ensis* los ácidos grasos palmítico y esteárico representan el 40-45%, mientras en *Solen* se corresponde con el 55% del total de ácidos grasos.

En *E. arcuatus* el ácido graso más abundante en las membranas dentro de los AGMI es el oleico (18:1n9), seguido por el 18:1n7, con valores superiores a 1 ng individuo⁻¹. En las otras dos especies no se alcanza en los AGMI en ningún caso cantidades de 1 ng individuo⁻¹. El porcentaje de oleico es similar en las tres especies, mientras en el caso del 18:1n7 en *Solen* la contribución de este ácido graso al total es mayor que en *Ensis*.

VI. Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

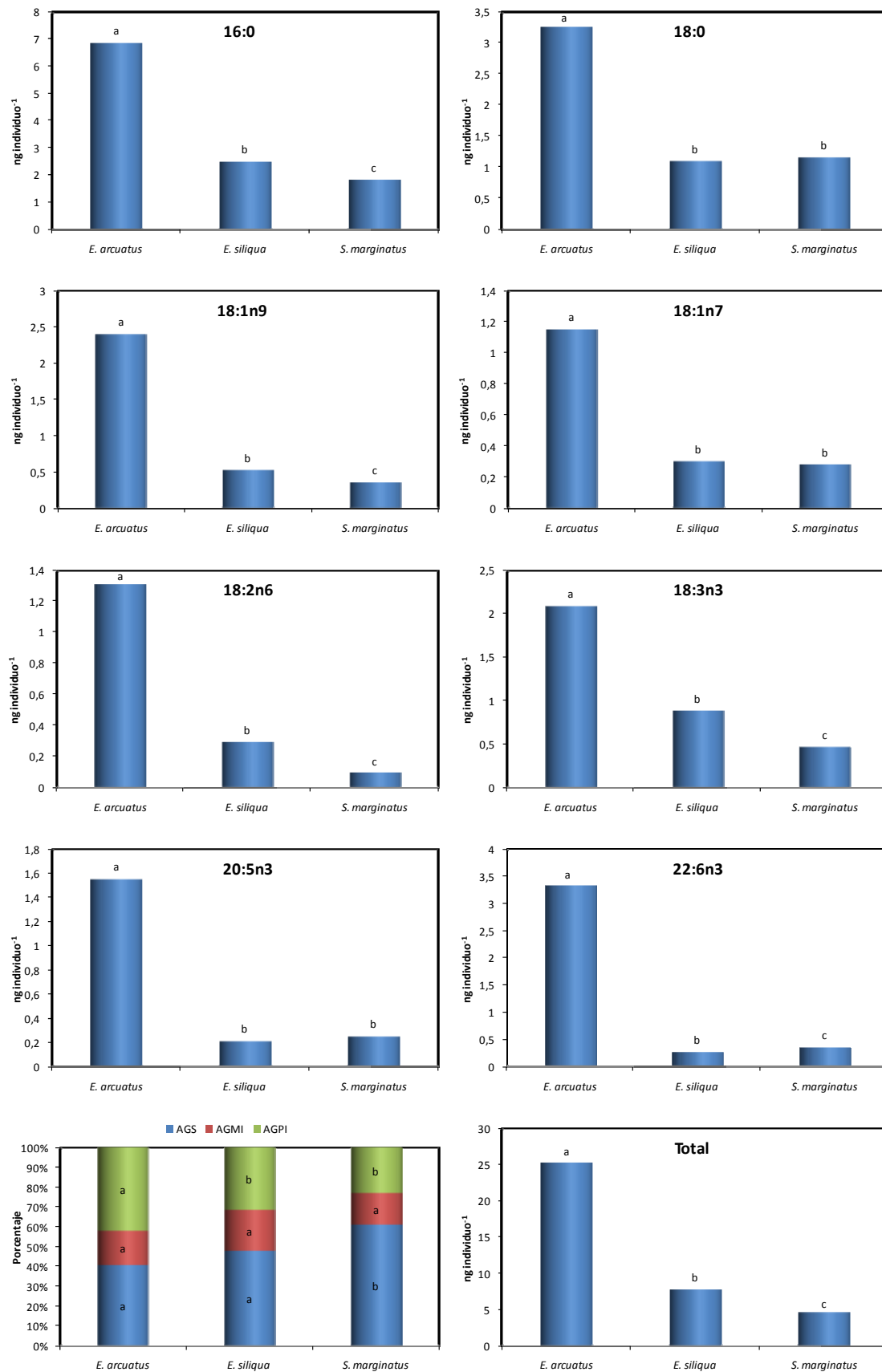


Fig. VI.13. Composición de ácidos grasos en la fracción de lípidos polares en la pediveliger de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*. Letras distintas indican diferencias significativas al 95% de confianza entre especies (test U de Mann-Whitney).

En los AGPI de los lípidos polares, *E. arcuatus* es la especie que acumula mayores cantidades, seguida por *E. siliqua* y *S. marginatus* en último lugar. Los ácidos grasos mayoritarios son, por orden de importancia: el DHA, el α -linolénico (18:3n3), el EPA y el linoleico (18:2n6).

En la formación de membranas en las pediveliger se diferencian dos estrategias. Por una parte, las membranas de *E. arcuatus* están compuestas por igual por AGS y AGPI, mientras en *E. siliqua* y *S. marginatus* se forman principalmente a partir de AGS, si bien en el caso de esta última especie el porcentaje es significativamente mayor.

En los ácidos grasos totales *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus* tienen 25, 8 y 5 ng individuo⁻¹, respectivamente.

VI.4.2.4.- Postlarva

VI.4.2.4.1.- Lípidos neutros

En la tabla VI.5 se presentan los datos de los días de cultivo, longitud y peso seco de las tres especies estudiadas. El mayor tamaño y peso seco se corresponde con las postlarvas de *E. arcuatus*, que tardan 20 días en superar el desarrollo larvario. Se puede ver como hay una relación entre la duración del desarrollo larvario, la longitud y el peso seco, de modo que, cuanto más largo es el desarrollo larvario, mayor es la talla y peso seco de las postlarvas recién fijadas en las tres especies.

Tabla VI.5. Días de cultivo, longitud y peso seco de las postlarvas recién fijadas de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*.

| | <i>E. arcuatus</i> | <i>E. siliqua</i> | <i>S. marginatus</i> |
|--|--------------------|-------------------|----------------------|
| Días | 20 | 15 | 8-9 |
| Longitud (μ m) | 324,84-382,35 | 301,39-361,52 | 268,01-303,99 |
| Peso seco (μ g ind. ⁻¹) | 3,26-6,78 | 2,59-4,06 | 2,15-2,18 |

En la postlarva recién metamorfoseada, el ácido palmítico (16:0) es el más abundante de los AGS (Fig. VI.14). En los tres ácidos grasos saturados principales, *E. arcuatus* forma un grupo significativamente distinto al 95% de confianza, mientras las otras dos especies presentan cantidades similares en los ácidos mirístico y palmítico y son distintos en el ácido esteárico (18:0).

VI. Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

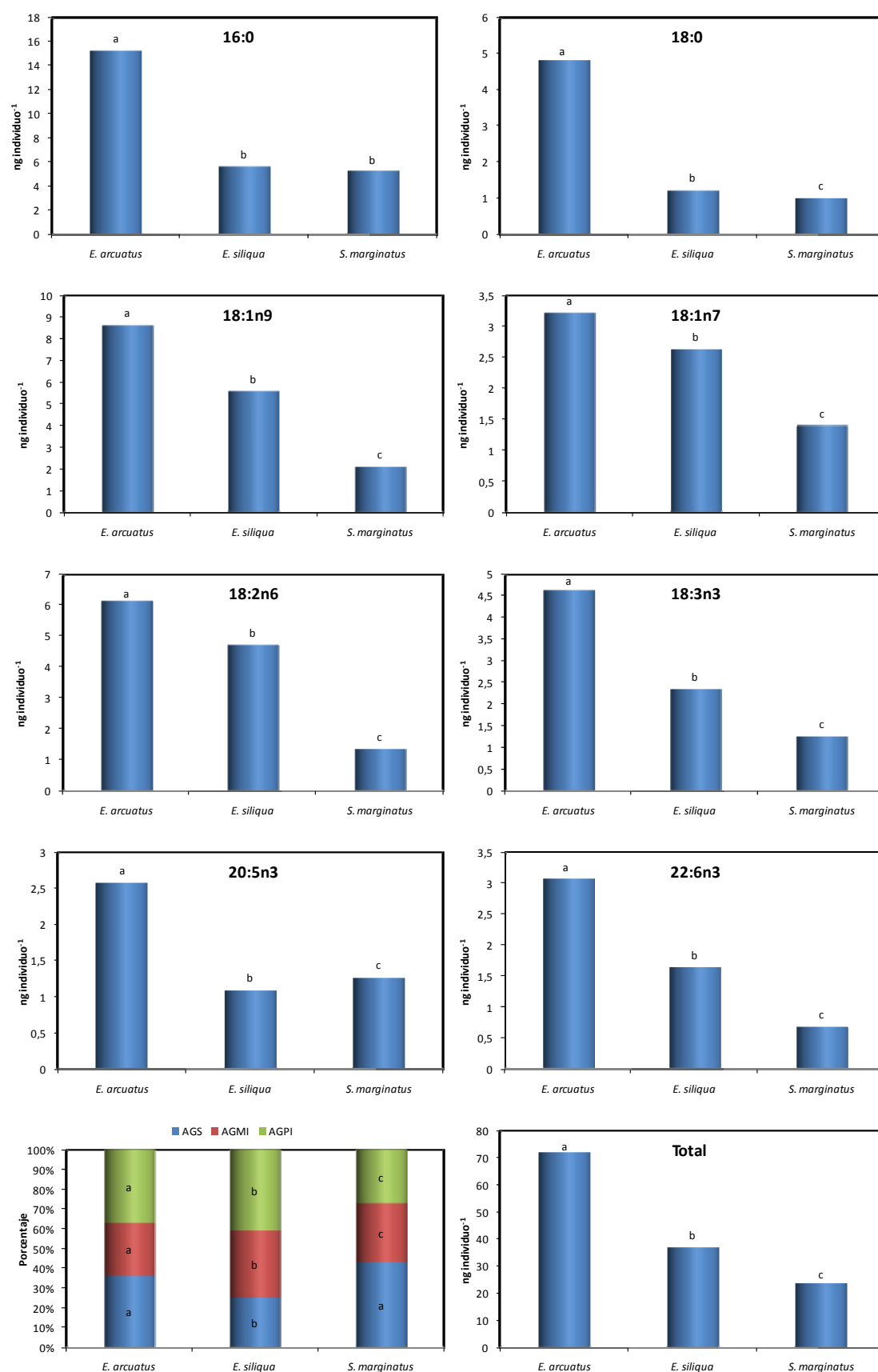


Fig. VI.14. Composición de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros en la postlarva de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*. Letras distintas indican diferencias significativas al 95% de confianza entre especies (test U de Mann-Whitney).

En los AGMI en las dos especies de *Ensis* el ácido graso mayoritario es el oleico (18:1n9). El segundo más importante varía dentro de *Ensis*, siendo en *E. arcuatus* el palmitoleico y en *E. siliqua* el 18:1n7.

En *Ensis* los principales AGPI, por orden de importancia son: el linoleico (18:2n6) y α -linolénico (18:3n3), mientras en *Solen* son linoleico (18:2n6), el EPA y el α -linolénico (18:3n3).

En la postlarva de *E. siliqua* se acumulan preferentemente AGPI, mientras *E. arcuatus* presenta porcentajes similares de AGS y de AGPI. En el caso de *S. marginatus* se acumulan preferentemente AGS (43%) y proporciones similares de AGMI y AGPI.

En los lípidos neutros en *E. arcuatus* se produce un acumulo de ácidos grasos totales dos veces mayor que en *E. siliqua* y tres veces mayor que en *S. marginatus*.

VI.4.2.4.2.- Lípidos polares

En los AGS de los lípidos polares en las postlarvas se puede apreciar, igual que en los lípidos neutros, las cantidades elevadas presentes en *E. arcuatus* comparadas con las otras dos especies (Fig. VI.15). El ácido palmítico (16:0) es el principal ácido graso, tanto en los AGS como en los ácidos grasos totales. En los ácidos grasos 16:0 y 18:0 *E. arcuatus* forma un grupo estadísticamente diferenciado del grupo de *E. siliqua* y *S. marginatus*.

En las dos especies de *Ensis* los ácidos grasos oleico (18:1n9) y 18:1n7 son los principales de los AGMI por este orden, mientras en *S. marginatus* lo son en orden inverso, y con una diferencia muy ligera entre los valores. En el caso del 18:1n7, *E. arcuatus* y *S. marginatus* presentan cantidades similares.

VI. Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

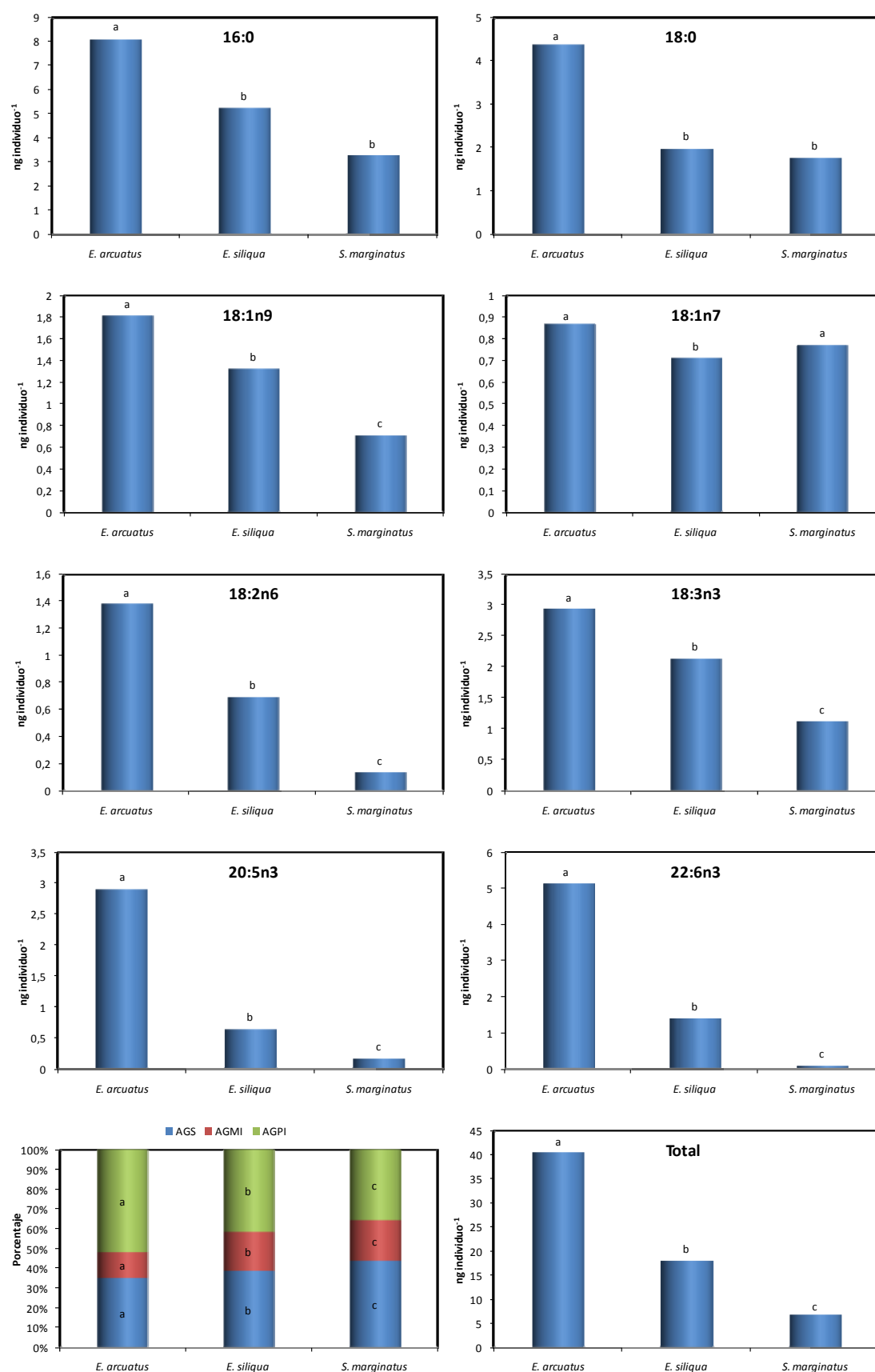


Fig. VI.15. Composición de ácidos grasos en la fracción de lípidos polares en la postlarva de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*. Letras distintas indican diferencias significativas al 95% de confianza entre especies (test U de Mann-Whitney).

En los AGPI en las tres especies los ácidos grasos más abundantes son, el α -linolénico (18:3n3), el EPA y el DHA. Sin embargo, en *E. arcuatus* los contenidos de los dos primeros son prácticamente similares (2,9 ng individuo⁻¹) y en las otras dos especies los contenidos son muy superiores en el caso del ácido α -linolénico, con respecto a los otros dos ácidos grasos. En *E. siliqua* el contenido de DHA es superior al de EPA. En *S. marginatus* el contenido en DHA es muy bajo, comparado con *Ensis*.

Las membranas de las postlarvas en *E. arcuatus* están formadas por AGPI, en *E. siliqua* están presentes AGS y AGPI, a partes casi iguales, y en *S. marginatus* tienen AGS y AGPI, aunque estos últimos están presentes en un menor porcentaje.

En las postlarvas el contenido total de ácidos grasos en lípidos polares en *E. arcuatus* es de 40 ng individuo⁻¹, siendo el doble del contenido de *E. siliqua* y seis veces mayor al de *S. marginatus*.

VI.4.3.- Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario de navaja (*Ensis arcuatus*)

VI.4.3.1.- Lípidos neutros

A lo largo del desarrollo larvario en la fracción de lípidos neutros, el ácido graso mayoritario en los AGS es el palmítico (16:0) (Tabla VI.6). En los monoinsaturados (AGMI), los principales son el 18:1n7 y el ácido oleico (18:1n9).

En los poliinsaturados (AGPI), los distintos ácidos grasos mayoritarios siguen distintas tendencias. En los ovocitos el ácido graso principal es el ácido graso esencial 20:5n3 (EPA), seguido por el también esencial docosaheptaenoico (DHA, 22:6n3). Por su parte, el DHA se va incrementando paulatinamente hasta los 15 días, aumentando de una forma importante en la fijación.

Hay otros ácidos grasos que son minoritarios en los ovocitos y larvas D y que, a los 20 días son mayoritarios, como el 18:2n6 (linoleico) y el 18:3n3 (α -linolénico).

VI. Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

Tabla VI.6. Composición de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros en *E. arcuatus* a lo largo del desarrollo larvario. Valores expresados en ng individuo⁻¹ (n=6), como media±desviación estándar.

| | Ovocito | Larva D | 8 días | 15 días | 20 días |
|----------------|------------|------------|-----------|------------|------------|
| 14:0 | 0,18±0,02 | 0,05±0,02 | 0,23±0,03 | 2,79±1,36 | 4,97±0,38 |
| 16:0 | 1,35±0,22 | 2,40±0,49 | 0,93±0,42 | 4,27±0,32 | 15,21±3,61 |
| 18:0 | 0,38±0,10 | 0,57±0,19 | 0,33±0,09 | 2,31±0,71 | 4,81±1,33 |
| 16:1n7 | 0,61±0,09 | 0,75±0,10 | 1,53±0,25 | 2,18±0,77 | 4,84±0,99 |
| 18:1n9 | 0,15±0,03 | 0,29±0,07 | 1,52±0,29 | 2,01±0,67 | 8,63±1,51 |
| 18:1n7 | 0,38±0,09 | 0,54±0,14 | 0,20±0,03 | 2,98±1,20 | 3,29±0,00 |
| 20:1n11 | 0,03±0,01 | 0,05±0,01 | 0,02±0,01 | 0,17±0,16 | 0,22±0,02 |
| 20:1n9 | 0,11±0,02 | 0,23±0,05 | 0,08±0,02 | 0,93±0,05 | 1,29±0,13 |
| 20:1n7 | 0,12±0,05 | 0,28±0,09 | 0,06±0,02 | 0,35±0,33 | 0,15±0,05 |
| 18:2n6 | 0,05±0,01 | 0,05±0,01 | 1,13±0,05 | 1,58±0,52 | 6,13±2,18 |
| 18:2n4 | 0,06±0,01 | 0,11±0,05 | 0,08±0,00 | 0,05±0,01 | 0,16±0,03 |
| 18:3n6 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,09±0,00 | 0,17±0,10 | 0,41±0,10 |
| 18:3n3 | 0,06±0,01 | 0,06±0,00 | 1,93±0,04 | 1,93±0,91 | 4,66±0,31 |
| 18:4n3 | 0,15±0,01 | 0,46±0,07 | 1,88±0,16 | 0,88±0,29 | 3,93±0,90 |
| 20:2i | 0,01±0,00 | 0,03±0,01 | 0,03±0,01 | 0,06±0,02 | 0,09±0,02 |
| 20:2j | 0,01±0,00 | 0,02±0,00 | 0,01±0,00 | 0,03±0,01 | 0,34±0,01 |
| 20:2n6 | 0,09±0,02 | 0,14±0,03 | 0,09±0,02 | 1,61±0,47 | 2,03±0,38 |
| 20:3n6 | 0,03±0,01 | 0,05±0,02 | 0,02±0,01 | 0,22±0,00 | 0,15±0,01 |
| ARA | 0,08±0,02 | 0,11±0,03 | 0,06±0,03 | 0,59±0,05 | 0,46±0,03 |
| 20:4n3 | 0,09±0,01 | 0,12±0,05 | 0,03±0,01 | 0,05±0,00 | 0,21±0,22 |
| EPA | 1,58±0,21 | 1,92±0,55 | 0,17±0,05 | 1,58±0,53 | 2,58±0,29 |
| 21:4n6 | 0,01±0,00 | 0,03±0,01 | 0,02±0,01 | 0,23±0,07 | 0,32±0,01 |
| 21:5n3 | 0,08±0,01 | 0,20±0,04 | 0,05±0,01 | 0,07±0,01 | 0,32±0,04 |
| 22:2i | 0,05±0,00 | 0,16±0,03 | 0,03±0,01 | 0,08±0,01 | 2,35±0,04 |
| 22:2j | 0,04±0,00 | 0,12±0,02 | 0,03±0,01 | 0,07±0,02 | 0,22±0,04 |
| 22:4n6 | 0,04±0,01 | 0,08±0,02 | 0,16±0,03 | 0,09±0,02 | 0,22±0,04 |
| 22:5n6 | 0,01±0,00 | 0,04±0,00 | 0,05±0,02 | 0,23±0,12 | 0,61±0,08 |
| 22:5n3 | 0,00±0,00 | 0,02±0,00 | 0,02±0,00 | 0,03±0,00 | 0,11±0,01 |
| DHA | 0,52±0,05 | 0,70±0,14 | 1,78±0,03 | 1,50±0,25 | 3,08±0,46 |
| AGS | 1,83±0,31 | 2,83±0,34 | 1,53±0,45 | 7,10±0,87 | 24,99±2,70 |
| AGMI | 1,32±0,20 | 1,96±0,24 | 1,58±0,17 | 5,94±1,11 | 18,42±1,90 |
| n9 | 0,25±0,05 | 0,42±0,10 | 1,56±0,26 | 2,24±0,58 | 9,92±1,48 |
| n7 | 1,11±0,14 | 1,48±0,21 | 0,57±0,69 | 4,03±0,66 | 8,28±1,55 |
| AGPI | 2,67±0,29 | 2,53±1,51 | 1,96±0,27 | 4,59±0,79 | 25,38±3,66 |
| n6 | 0,29±0,03 | 0,35±0,21 | 1,52±0,03 | 2,54±0,48 | 10,01±1,13 |
| n3 | 2,35±0,26 | 2,55±1,13 | - | 2,20±0,72 | 14,89±1,69 |
| EPA/ARA | 20,81±4,76 | 17,52±4,04 | 2,80±0,75 | 1,97±0,16 | 5,61±0,04 |
| DHA/EPA | 0,32±0,02 | 0,34±0,02 | 0,40±0,00 | 0,95±0,65 | 1,19±0,15 |
| n3/n6 | 8,25±0,81 | 5,50±0,44 | - | 0,70±0,07 | 1,49±0,01 |
| TOTAL | 5,95±0,63 | 7,32±1,44 | 6,13±1,43 | 19,83±1,57 | 71,79±5,30 |

Estudiando la composición de ácidos grasos no-metilén-interrumpidos (AGNMI), los del 20:2 se encuentran en menor cantidad que los 22:2, encontrándose el isómero i en mayor proporción que el j. En general, se observa un pequeño aumento en el paso de ovocito a larva D, con disminución posterior, y al final del estudio, en la fase de postlarva (20 días), un aumento importante.

El contenido total de ácidos grasos por individuo, es relativamente estable desde el ovocito hasta el octavo día de desarrollo, variando entre 6 y 7 ng individuo⁻¹. A los 15 días se triplica y en la metamorfosis (20 días) el contenido total es de 72 ng individuo⁻¹.

En la figura VI.16 se representa la evolución de los ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros a lo largo del desarrollo larvario, de tal modo que se muestran las variaciones en porcentaje en cada estadio de cada ácido graso con respecto al total de ganancias o pérdidas. Se observa como en los lípidos neutros, en el paso de ovocito a larva D, se produce un aumento de 1371 pg larva⁻¹, sólo descendiendo el ácido graso saturado mirístico (14:0). En el paso de larva D a larva de 8 días, en el total se produce un descenso de los ácidos grasos totales por individuo y día, aumentando de forma exponencial durante la pediveliger y postlarva.

El EPA, ácido graso con un papel fundamentalmente energético en los lípidos neutros, sólo desciende en el paso de larva D a larva de 8 días (representando el 36% de las pérdidas), período en el que la larva tiene un comportamiento mixotrófico. En este período también disminuyen significativamente el ácido palmítico (16:0), el esteárico (18:0), el 18:1n7 y los AGNMI 22:2, en sus isómeros i y j.

En el paso de larva de 8 días a pediveliger (15 días) el DHA disminuye, contribuyendo con un 20% al total de pérdidas, produciéndose ganancias en el 16:0, 18:0 y 18:1n7.

En el paso de pediveliger a postlarva se observa un aumento generalizado en todos los ácidos grasos.

VI. Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

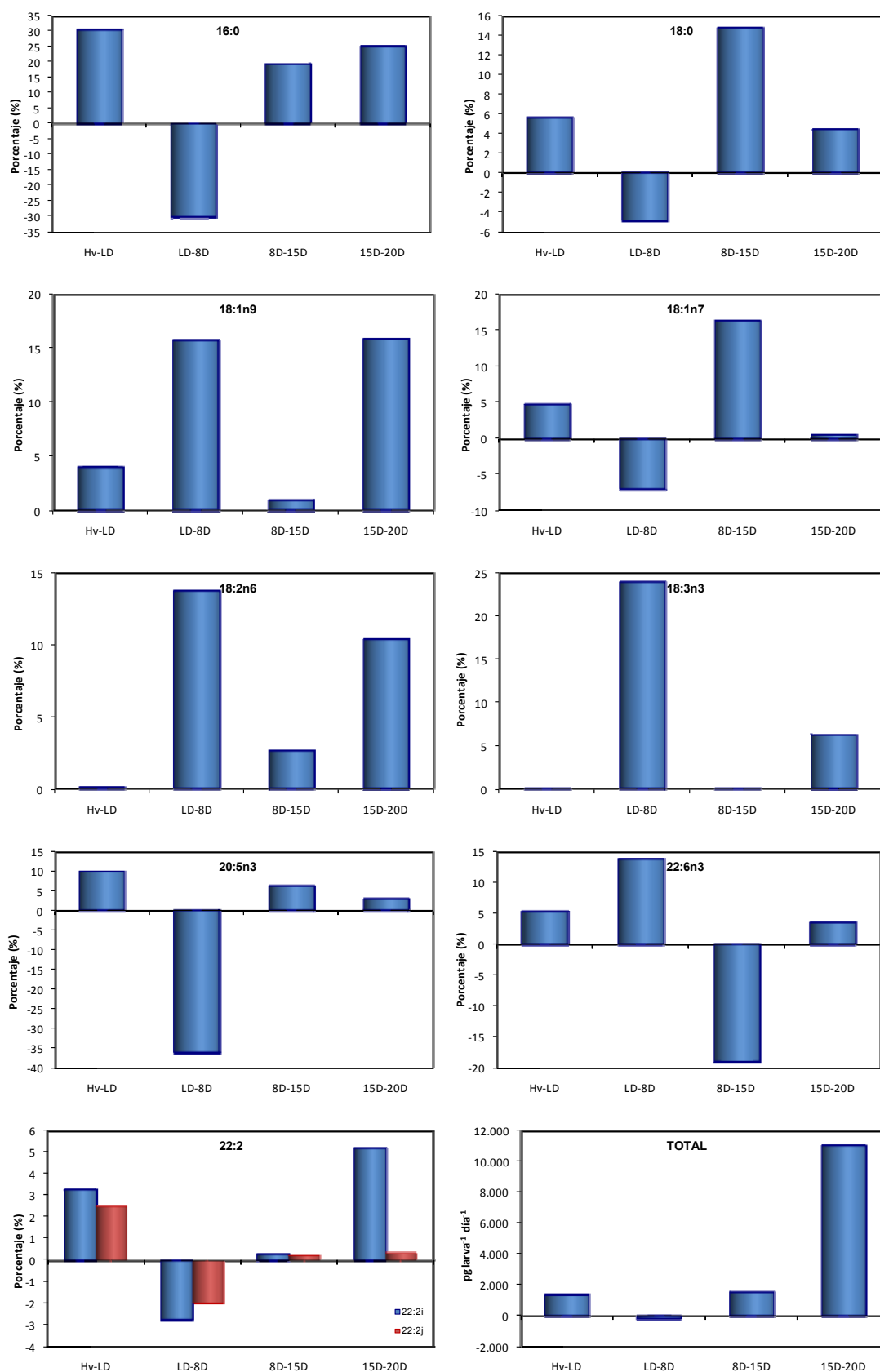


Fig. VI.16. Evolución de los ácidos grasos en los lípidos neutros (LN) a lo largo del desarrollo larvario en *E. arcuatus*. Hv-LD: paso de ovocito a larva D; LD-8D: paso de larva D a 8 días; 8D-15D: paso de larva de 8 días a pediveliger; 15D-20D: paso de pediveliger a postlarva. TOTAL: variación diaria del contenido total entre estadios, expresado en $\text{pg larva}^{-1} \text{ día}^{-1}$.

VI.4.3.2.- Lípidos polares

En la fracción de lípidos polares encontramos también, como ácido graso mayoritario en los AGS, el palmítico (16:0) (Tabla VI.7). Éste aumenta de forma constante de ovocito a larva de 8 días, para posteriormente aumentar bruscamente a los 15 y 20 días. Dentro de los AGS, le sigue en importancia el ácido esteárico (18:0), que tiene un comportamiento similar.

En los AGMI en los ovocitos, las cantidades son pequeñas en todos los ácidos grasos estudiados, variando entre 0,01 y 0,03 ng individuo⁻¹. Igual que en los lípidos neutros, los ácidos grasos principales son el ácido palmitoleico (16:1n7), el 18:1n7 y el oleico (18:1n9), al que hay que añadir el 20:1n9 en la pediveliger y la postlarva. Las cantidades siguen siendo relativamente pequeñas desde ovocito hasta los 8 días, momento a partir del cual se observa un incremento importante.

En los ovocitos los AGPI principales son el EPA y el DHA. El EPA se mantiene constante desde ovocito hasta la fase larvaria de 8 días, para posteriormente triplicarse sucesivamente a los 15 y 20 días de cultivo. Por el contrario, el DHA aumenta de una forma más o menos constante hasta los 8 días, cuadruplicándose a los 15 días y aumentando ligeramente en la fijación.

Otros ácidos grasos son minoritarios en los ovocitos y larvas D, pero a los 20 días son mayoritarios, como el 18:2n6 (linoleico), el 18:3n3 (α -linolénico) y el 20:2n6.

En los ovocitos, dentro de los AGNMI, sólo los isómeros 22:2 están presentes, puesto que los isómeros del 20:2 no se han podido detectar o están en contenidos traza. El isómero 22:2i aumenta a una mayor tasa que el 22:2j.

Los contenidos totales de lípidos polares son inferiores a los de lípidos neutros. En el paso de ovocito a larva D hay un ligero incremento, que en las fases posteriores estudiadas aumenta, haciéndolo de forma importante en la pediveliger (15 días) y en la fijación donde alcanza 40 ng individuo⁻¹.

VI. Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

Tabla VI.7. Composición de ácidos grasos en la fracción de lípidos polares en *E. arcuatus* a lo largo del desarrollo larvario. Valores expresados en ng individuo⁻¹ (n=6), como media±desviación estándar.

| | Ovocito | Larva D | 8 días | 15 días | 20 días |
|----------------|------------|-----------|-----------|------------|------------|
| 14:0 | 0,01±0,00 | 0,05±0,02 | 0,03±0,01 | 0,35±0,08 | 0,87±0,05 |
| 16:0 | 0,23±0,03 | 0,45±0,08 | 0,97±0,38 | 6,85±0,81 | 8,09±0,14 |
| 18:0 | 0,12±0,02 | 0,35±0,06 | 0,48±0,05 | 3,26±0,65 | 4,37±0,71 |
| 16:1n7 | 0,02±0,00 | 0,06±0,01 | 0,09±0,01 | 0,66±0,13 | 0,85±0,12 |
| 18:1n9 | 0,02±0,00 | 0,06±0,01 | 0,25±0,04 | 2,40±0,29 | 1,81±0,38 |
| 18:1n7 | 0,03±0,00 | 0,07±0,01 | 0,15±0,03 | 1,15±0,17 | 0,87±0,01 |
| 20:1n11 | 0,01±0,00 | 0,02±0,00 | 0,04±0,00 | 0,14±0,03 | 0,27±0,03 |
| 20:1n9 | 0,02±0,00 | 0,03±0,01 | 0,05±0,01 | 1,18±0,27 | 0,83±0,28 |
| 20:1n7 | 0,02±0,00 | 0,05±0,01 | 0,13±0,01 | 0,19±0,04 | 0,27±0,03 |
| 18:2n6 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,24±0,04 | 1,31±0,42 | 1,38±0,57 |
| 18:2n4 | 0,00±0,00 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,15±0,03 | 0,04±0,00 |
| 18:3n6 | 0,00±0,00 | 0,02±0,00 | 0,03±0,01 | 0,05±0,02 | 0,17±0,03 |
| 18:3n3 | 0,02±0,00 | 0,02±0,00 | 0,32±0,05 | 2,08±0,25 | 2,94±0,83 |
| 18:4n3 | 0,02±0,00 | 0,02±0,01 | 0,12±0,05 | 0,58±0,11 | 1,32±0,10 |
| 20:2i | 0,00±0,00 | 0,01±0,00 | 0,09±0,00 | 0,04±0,01 | 0,14±0,03 |
| 20:2j | 0,00±0,00 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,07±0,00 |
| 20:2n6 | 0,01±0,00 | 0,04±0,01 | 0,24±0,03 | 1,67±0,54 | 1,01±0,11 |
| 20:3n6 | 0,00±0,00 | 0,02±0,00 | 0,04±0,01 | 0,13±0,02 | 0,14±0,02 |
| ARA | 0,03±0,00 | 0,06±0,01 | 0,20±0,02 | 0,73±0,19 | 0,75±0,11 |
| 20:4n3 | 0,03±0,01 | 0,03±0,00 | 0,05±0,02 | 0,10±0,02 | 0,16±0,01 |
| EPA | 0,55±0,08 | 0,53±0,12 | 0,50±0,00 | 1,55±0,37 | 2,90±0,48 |
| 21:4n6 | 0,00±0,00 | 0,01±0,00 | 0,02±0,00 | 0,19±0,03 | 0,49±0,15 |
| 21:5n3 | 0,04±0,01 | 0,06±0,00 | 0,23±0,02 | 0,87±0,15 | 1,66±0,14 |
| 22:2i | 0,05±0,01 | 0,07±0,02 | 0,34±0,01 | 1,04±0,38 | 1,90±0,14 |
| 22:2j | 0,02±0,00 | 0,05±0,01 | 0,13±0,02 | 0,32±0,01 | 0,40±0,02 |
| 22:4n6 | 0,04±0,01 | 0,12±0,02 | 0,17±0,03 | 0,27±0,03 | 0,22±0,01 |
| 22:5n6 | 0,01±0,00 | 0,02±0,00 | 0,13±0,01 | 0,67±0,04 | 1,16±0,13 |
| 22:5n3 | 0,00±0,00 | 0,01±0,00 | 0,10±0,03 | 0,05±0,00 | 0,19±0,01 |
| DHA | 0,16±0,02 | 0,33±0,03 | 0,82±0,07 | 3,33±0,75 | 5,15±0,62 |
| AGS | 0,33±0,05 | 0,80±0,05 | 1,45±0,24 | 10,70±1,19 | 13,33±1,86 |
| AGMI | 0,08±0,02 | 0,28±0,02 | 0,56±0,08 | 5,73±0,74 | 4,86±0,38 |
| n9 | 0,03±0,00 | 0,08±0,00 | 0,27±0,03 | 2,43±0,09 | 2,64±0,21 |
| n7 | 0,06±0,01 | 0,05±0,01 | 0,24±0,03 | 1,67±0,03 | 1,95±0,27 |
| AGPI | 0,52±0,39 | 1,26±0,03 | 2,61±0,21 | 11,04±1,83 | 19,68±1,41 |
| n6 | 0,08±0,01 | 0,24±0,04 | 0,66±0,02 | 4,52±0,92 | 5,32±0,70 |
| n3 | 0,74±0,07 | 1,02±0,05 | 1,94±0,19 | 6,89±1,35 | 14,32±1,36 |
| EPA/ARA | 19,14±0,04 | 9,60±1,68 | 2,46±0,00 | 2,35±0,28 | 3,87±0,40 |
| DHA/EPA | 0,36±0,01 | 0,57±0,11 | 1,67±0,02 | 2,79±0,33 | 1,78±0,06 |
| n3/n6 | 8,66±1,44 | 3,84±0,22 | 3,09±0,05 | 1,62±0,56 | 2,69±0,17 |
| TOTAL | 1,17±0,13 | 1,93±0,26 | 4,62±0,19 | 25,16±3,85 | 40,38±1,37 |

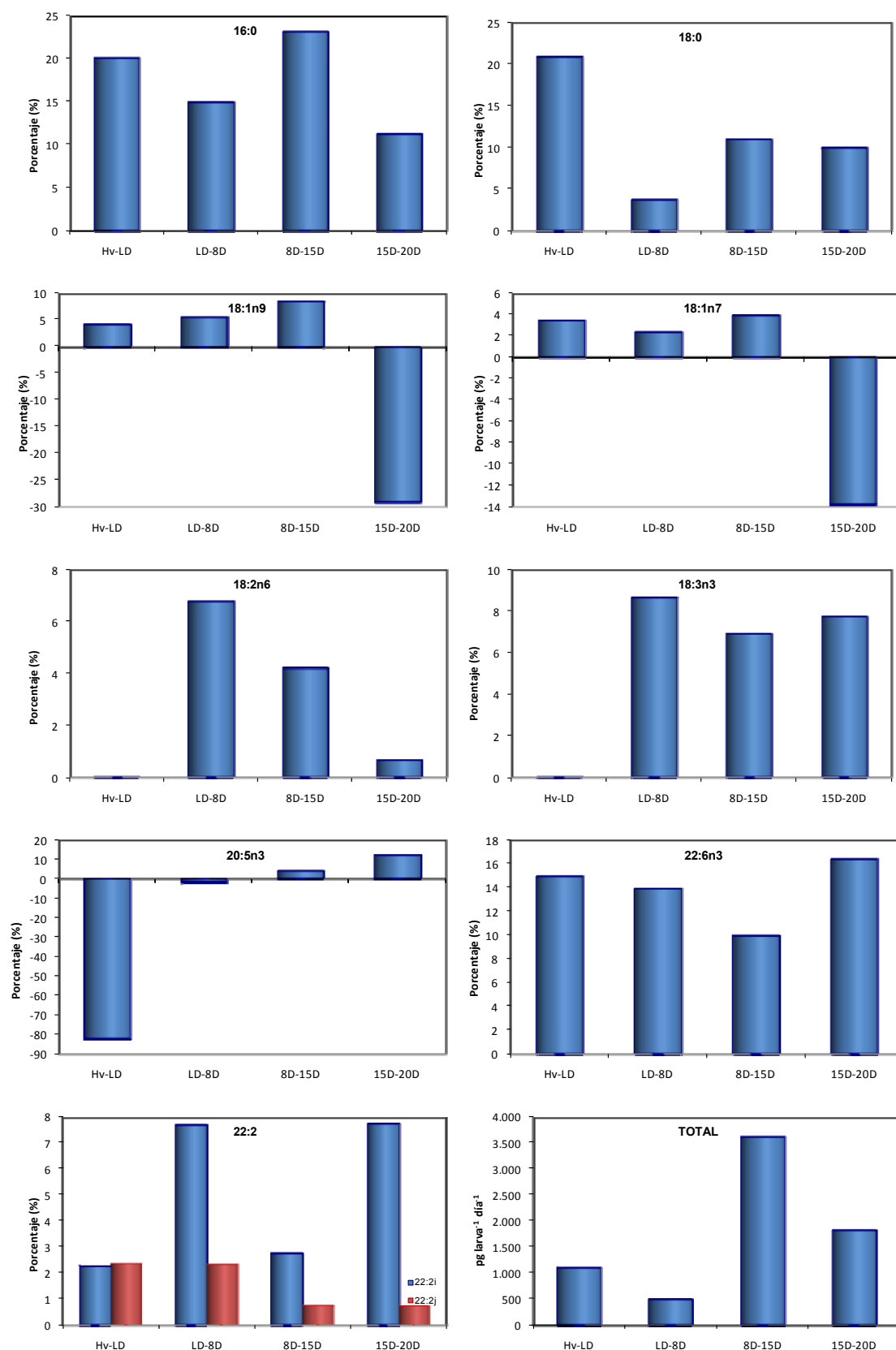


Fig. VI.17. Evolución de los ácidos grasos en los lípidos polares (LP) a lo largo del desarrollo larvario en *E. arcuatus*. Hv-LD: paso de ovocito a larva D; LD-8D: paso de larva D a 8 días; 8D-15D: paso de larva de 8 días a pediveliger; 15D-20D: paso de pediveliger a postlarva. TOTAL: variación diaria del contenido total entre estadios expresado en $\text{pg larva}^{-1} \text{ día}^{-1}$.

En la figura VI.17 se exponen las evoluciones a lo largo del desarrollo en la fracción de lípidos polares. Durante el paso de ovocito a larva D el saldo neto es positivo, soportando el EPA el 82% del descenso y el resto el ácido linolénico (18:3n3). En el paso de 8 días a pediveliger (15 días) hay un descenso marcado del AGPI 22:5n3 y, en el paso a postlarva, aumentan todos los ácidos grasos estudiados.

En todas las comparaciones entre estadios se produce un aumento de los lípidos polares por individuo.

VI.4.4.- Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario del longueirón (*Ensis siliqua*)

VI.4.4.1.- Lípidos neutros

En la fracción de lípidos neutros (de reserva) el principal AGS en los ovocitos de *E. siliqua* es el palmítico (16:0), estando el mirístico (14:0) y el esteárico (18:0) presentes en cantidades similares (Tabla VI.8). En la larva D estos tres ácidos grasos presentan un ligero descenso, comportándose a partir de aquí de forma distinta cada uno, y aumentando con diferentes tasas.

Los AGMI mayoritarios de los lípidos de reserva en los ovocitos son el palmitoleico (16:1n7) y el 18:1n7. El oleico (18:1n9), aunque presenta valores inferiores a los dos anteriores, es el que alcanza valores superiores en la fijación. Los tres aumentan de forma brusca a los 15 días de cultivo (metamorfosis), siendo el oleico el único que está presente en cantidades elevadas en la pediveliger (8 días).

En los ovocitos el EPA es el AGPI principal de los lípidos neutros, con el doble de cantidad por individuo que el DHA y el 18:4n3. Estos dos últimos muestran un comportamiento similar, sin variación de ovocito a larva D, y aumentando de forma significativa en la pediveliger y postlarva (8 y 15 días, respectivamente). Sin embargo, el EPA mantiene en la larva D los valores de los ovocitos, sufriendo un brusco descenso en la pediveliger y un aumento hasta superar los valores iniciales en la postlarva.

Tabla VI.8. Composición de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros en *E. siliqua* a lo largo del desarrollo larvario. Valores expresados en ng individuo⁻¹ (n=6), como media±desviación estándar.

| | Ovocito | Larva D | 8 días | 15 días |
|----------------|-------------|------------|------------|------------|
| 14:0 | 0,25±0,02 | 0,17±0,04 | 1,10±0,21 | 2,63±0,80 |
| 16:0 | 1,67±0,25 | 1,23±0,16 | 2,33±0,04 | 5,59±1,36 |
| 18:0 | 0,26±0,03 | 0,27±0,05 | 0,47±0,03 | 1,21±0,14 |
| 16:1n7 | 0,68±0,07 | 0,40±0,05 | 0,43±0,07 | 1,89±0,68 |
| 18:1n9 | 0,22±0,03 | 0,19±0,03 | 1,41±0,60 | 5,59±0,45 |
| 18:1n7 | 0,34±0,05 | 0,30±0,03 | 0,86±0,03 | 2,63±0,20 |
| 20:1n11 | 0,02±0,01 | 0,03±0,00 | 0,19±0,01 | 0,51±0,06 |
| 20:1n9 | 0,10±0,01 | 0,10±0,01 | 0,15±0,05 | 0,52±0,12 |
| 20:1n7 | 0,03±0,01 | 0,02±0,01 | 0,05±0,02 | 0,11±0,04 |
| 18:2n6 | 0,06±0,02 | 0,04±0,02 | 1,22±0,09 | 4,71±0,48 |
| 18:2n4 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,01±0,00 | 0,14±0,02 |
| 18:3n6 | 0,05±0,01 | 0,04±0,00 | 0,00±0,00 | 0,14±0,00 |
| 18:3n3 | 0,10±0,02 | 0,08±0,00 | 0,71±0,07 | 2,34±0,20 |
| 18:4n3 | 0,30±0,07 | 0,24±0,04 | 0,87±0,10 | 1,79±0,12 |
| 20:2i | 0,08±0,01 | 0,05±0,01 | 0,05±0,01 | 0,18±0,02 |
| 20:2j | 0,06±0,01 | 0,04±0,01 | 0,04±0,01 | 0,12±0,02 |
| 20:2n6 | 0,08±0,01 | 0,09±0,01 | 0,23±0,03 | 0,70±0,23 |
| 20:3n6 | 0,02±0,00 | 0,02±0,00 | 0,02±0,00 | 0,06±0,00 |
| ARA | 0,00±0,00 | 0,05±0,00 | 0,18±0,02 | 0,44±0,05 |
| 20:4n3 | 0,01±0,00 | 0,12±0,01 | 0,03±0,00 | 0,07±0,00 |
| EPA | 0,87±0,17 | 0,88±0,03 | 0,09±0,01 | 1,09±0,10 |
| 21:4n6 | 0,01±0,00 | 0,00±0,00 | 0,04±0,03 | 0,16±0,04 |
| 21:5n3 | 0,08±0,03 | 0,08±0,02 | 0,03±0,02 | 0,12±0,03 |
| 22:2i | 0,05±0,01 | 0,09±0,01 | 0,02±0,00 | 0,06±0,01 |
| 22:2j | 0,04±0,00 | 0,08±0,01 | 0,02±0,00 | 0,02±0,01 |
| 22:4n6 | 0,03±0,01 | 0,03±0,01 | 0,00±0,00 | 0,06±0,00 |
| 22:5n6 | 0,01±0,01 | 0,01±0,01 | 0,08±0,07 | 0,30±0,02 |
| 22:5n3 | 0,10±0,02 | 0,25±0,03 | 0,21±0,00 | 0,47±0,14 |
| DHA | 0,39±0,10 | 0,44±0,09 | 0,73±0,07 | 1,64±0,12 |
| AGS | 2,06±0,28 | 1,61±0,26 | 3,62±0,55 | 8,53±1,04 |
| AGMI | 1,35±0,06 | 1,04±0,11 | 3,20±0,11 | 11,94±0,93 |
| n9 | 0,29±0,05 | 0,31±0,01 | 2,11±0,09 | 6,21±0,50 |
| n7 | 0,95±0,12 | 0,72±0,08 | 0,89±0,03 | 5,18±0,47 |
| AGPI | 1,95±0,42 | 2,35±0,29 | 4,31±0,19 | 14,27±1,27 |
| n6 | 0,25±0,03 | 0,27±0,04 | 1,83±0,13 | 6,59±0,67 |
| n3 | 1,85±0,29 | 2,07±0,25 | 2,47±0,07 | 7,53±0,58 |
| EPA/ARA | 173,27±1,83 | 18,57±0,97 | 0,49±0,10 | 2,51±0,05 |
| DHA/EPA | 0,45±0,05 | 0,53±0,07 | 8,32±1,57 | 1,51±0,03 |
| n3/n6 | 7,13±0,69 | 7,35±0,31 | 1,35±0,06 | 1,14±0,03 |
| TOTAL | 5,40±0,29 | 5,18±0,18 | 11,49±0,13 | 36,87±3,30 |

En los ovocitos los AGS y los AGPI presentan cantidades similares. En la larva D se produce un descenso de los AGS y los AGMI, observándose un ligero aumento en los AGPI. En las fases de pediveliger y postlarva se observan aumentos en los tres grupos.

En los AGNMI en los lípidos neutros, los isómeros 20:2 están en mayor proporción que los 22:2. Mientras, en el paso de ovocito a larva D, ambos isómeros del

20:2 descienden, los del 22:2 aumentan. Al final del período de estudio hay un aumento en estos ácidos grasos.

Los ácidos grasos totales en los lípidos de reserva decrecen ligeramente de ovocito a larva D, para doblarse con respecto al valor anterior en la pediveliger y triplicarse en la postlarva respecto a la pediveliger, hasta alcanzar los 37 ng individuo⁻¹.

Si se comparan las evoluciones entre distintos estadios, se observa que únicamente en la transición de ovocito a larva D se produce un descenso en los lípidos neutros (de reserva) (Fig. VI.18). En esta fase el mayor descenso lo soporta el palmítico (16:0) (-43%).

En la transición de larva D a pediveliger (8 días), se produce un acumulo neto de ácidos grasos totales. Los mayores ácidos grasos que contribuyen más a este incremento son el mirístico (14:0), palmítico (16:0), oleico (18:1n9) y linoleico (18:2n6), con valores que rondan el 15% en todos los casos. Porcentualmente, el mayor descenso se observa en el EPA, que soporta el 68% de las pérdidas en esta fase.

En el paso de pediveliger a postlarva aumentan todos los ácidos grasos estudiados, principalmente el oleico (18:1n9), linoleico (18:2n6) y el palmítico (16:0) con 18%, 15% y 14% de contribución al aumento, respectivamente.

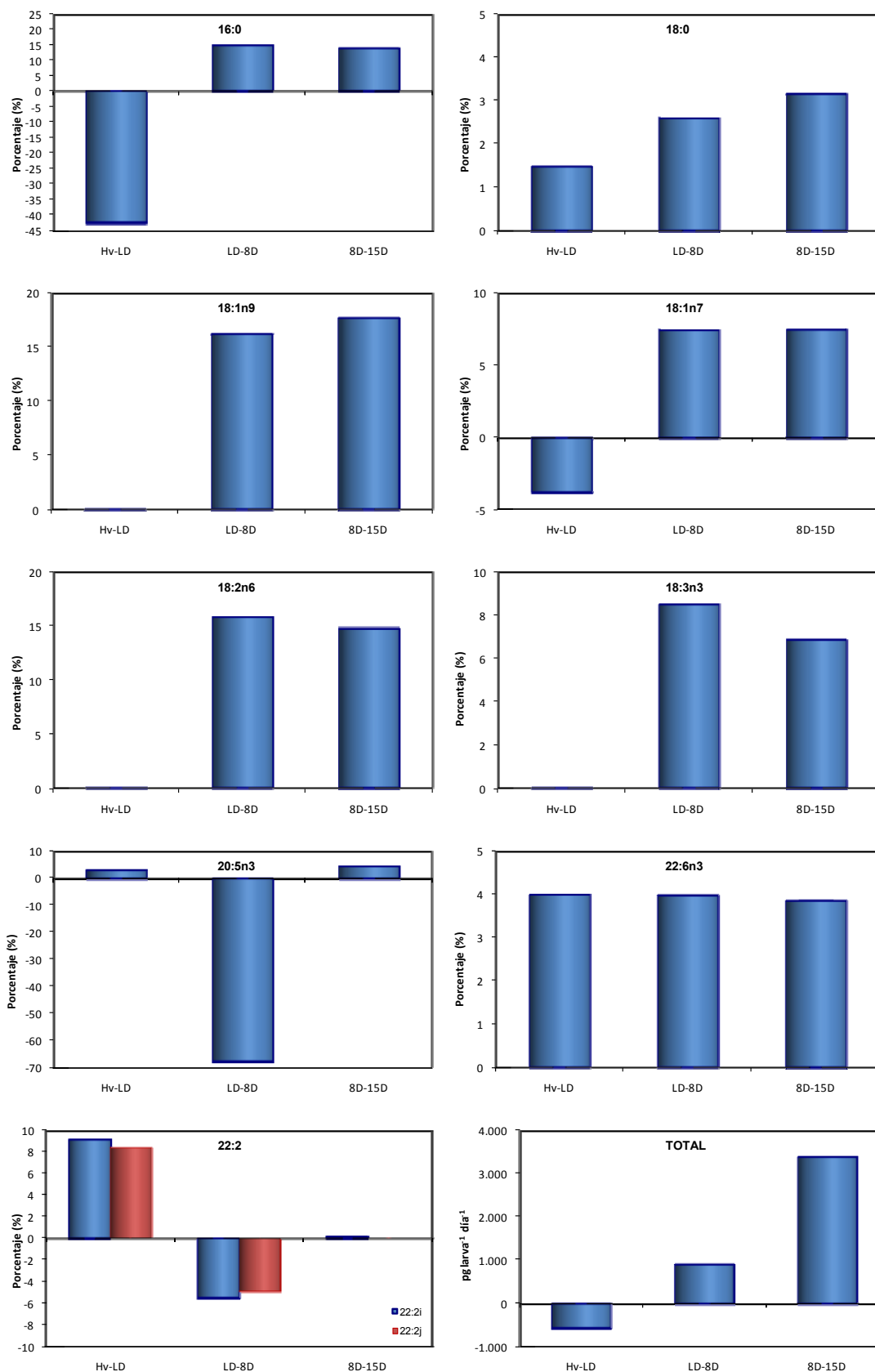


Fig. VI.18. Evolución de los ácidos grasos en los lípidos neutros (LN) a lo largo del desarrollo larvario en *E. siliqua*. Hv-LD: paso de ovocito a larva D; LD-8D: paso de larva D a pediveliger; 8D-15D: paso de pediveliger a postlarva. TOTAL: variación diaria del contenido total entre estadios, expresado en $\text{pg larva}^{-1} \text{ día}^{-1}$.

VI.4.4.2.- Lípidos polares

En la fracción de los lípidos polares (estructurales) en los AGS, el palmítico (16:0) es mayoritario, seguido del esteárico (18:0) (Tabla VI.9). Los tres ácidos grasos estudiados permanecen constantes desde ovocito hasta larva D (1 día), para posteriormente, aumentar de forma importante en la pediveliger y postlarva recién fijada.

Igual que sucede en los AGS, en los AGMI las cantidades de los distintos ácidos grasos son similares en ovocito y larva D, aunque los valores son mucho menores en los AGMI. Al final del cultivo, el oleico (18:1n9) y el 18:1n7 son los dos ácidos grasos mayoritarios.

El EPA es el principal AGPI, seguido por el DHA, que representa la mitad del EPA en los ovocitos. El EPA permanece constante a lo largo de todas las fases de estudio, a excepción de la fase de pediveliger (8 días). Por el contrario, el DHA sube en la larva D, para volver a los valores iniciales a los 8 días y aumentar mucho a los 15 días. El principal AGPI en la fijación es el α -linolénico (18:3n3), seguido por el DHA y el 20:2n6.

En los lípidos polares el AGNMI 22:2, se encuentra en una mayor cantidad que el 20:2, con diferencias desde la fase de ovocito, y con una proporción mayor del isómero i.

La evolución de los distintos ácidos grasos en los lípidos polares a lo largo del desarrollo larvario, muestra aumentos en el contenido total de ácidos grasos en los distintos períodos de estudio (Fig. VI.19). Siendo el saldo neto positivo en el paso de ovocito a larva D, con reducciones en los ácidos grasos α -linolénico (18:3n3) y palmítico (16:0), de mayor a menor contribución porcentual.

En el cambio de larva D a pediveliger (8 días), aumenta el total de ácidos grasos en 759 pg individuo⁻¹ día⁻¹, con un mayor aporte del palmítico (16:0) (41%) y esteárico (18:0), (17%). El mayor descenso porcentual en esta fase corresponde con el EPA.

Tabla VI.9. Composición de ácidos grasos en la fracción de lípidos polares en *E. siliqua* a lo largo del desarrollo larvario. Valores expresados en ng individuo⁻¹ (n=6), como media±desviación estándar.

| | Ovocito | Larva D | 8 días | 15 días |
|----------------|------------|------------|-----------|------------|
| 14:0 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,22±0,03 | 0,84±0,06 |
| 16:0 | 0,33±0,01 | 0,31±0,05 | 2,47±0,26 | 5,23±1,06 |
| 18:0 | 0,14±0,02 | 0,19±0,03 | 1,09±0,12 | 1,97±0,33 |
| 16:1n7 | 0,04±0,01 | 0,05±0,02 | 0,20±0,04 | 0,47±0,03 |
| 18:1n9 | 0,04±0,01 | 0,03±0,01 | 0,52±0,06 | 1,32±0,12 |
| 18:1n7 | 0,04±0,00 | 0,05±0,01 | 0,30±0,06 | 0,71±0,04 |
| 20:1n11 | 0,01±0,00 | 0,02±0,00 | 0,16±0,02 | 0,28±0,04 |
| 20:1n9 | 0,02±0,00 | 0,04±0,01 | 0,25±0,03 | 0,63±0,04 |
| 20:1n7 | 0,02±0,00 | 0,03±0,00 | 0,09±0,02 | 0,20±0,04 |
| 18:2n6 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,29±0,04 | 0,69±0,13 |
| 18:2n4 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |
| 18:3n6 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,02±0,00 | 0,06±0,01 |
| 18:3n3 | 0,04±0,01 | 0,03±0,00 | 0,88±0,25 | 2,13±0,31 |
| 18:4n3 | 0,04±0,02 | 0,03±0,00 | 0,08±0,02 | 0,23±0,05 |
| 20:2i | 0,01±0,00 | 0,02±0,00 | 0,06±0,01 | 0,14±0,02 |
| 20:2j | 0,01±0,00 | 0,02±0,00 | 0,03±0,00 | 0,08±0,01 |
| 20:2n6 | 0,02±0,00 | 0,04±0,00 | 0,30±0,05 | 1,00±0,10 |
| 20:3n6 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 |
| ARA | 0,04±0,01 | 0,06±0,00 | 0,10±0,02 | 0,40±0,07 |
| 20:4n3 | 0,04±0,01 | 0,03±0,00 | 0,03±0,02 | 0,25±0,03 |
| EPA | 0,62±0,08 | 0,69±0,03 | 0,21±0,03 | 0,65±0,19 |
| 21:4n6 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,06±0,01 | 0,14±0,01 |
| 21:5n3 | 0,07±0,01 | 0,12±0,01 | 0,22±0,04 | 0,80±0,21 |
| 22:2i | 0,07±0,01 | 0,12±0,01 | 0,24±0,02 | 0,99±0,11 |
| 22:2j | 0,06±0,01 | 0,10±0,01 | 0,11±0,01 | 0,38±0,02 |
| 22:4n6 | 0,04±0,00 | 0,06±0,01 | 0,04±0,00 | 0,17±0,05 |
| 22:5n6 | 0,03±0,01 | 0,03±0,00 | 0,09±0,02 | 0,54±0,03 |
| 22:5n3 | 0,09±0,02 | 0,28±0,02 | 0,21±0,02 | 0,43±0,09 |
| DHA | 0,27±0,08 | 0,53±0,01 | 0,27±0,03 | 1,40±0,05 |
| AGS | 0,42±0,15 | 0,35±0,12 | 3,68±0,46 | 6,85±0,97 |
| AGMI | 0,17±0,04 | 0,20±0,05 | 1,47±0,26 | 3,57±0,26 |
| n9 | 0,05±0,03 | 0,07±0,01 | 0,79±0,08 | 2,00±0,10 |
| n7 | 0,10±0,01 | 0,09±0,02 | 0,58±0,13 | 1,38±0,08 |
| AGPI | 0,96±0,56 | 1,57±0,72 | 2,54±0,20 | 7,42±1,51 |
| n6 | 0,10±0,05 | 0,18±0,03 | 0,63±0,32 | 2,52±0,45 |
| n3 | 0,86±0,52 | 1,42±0,64 | 1,59±0,26 | 4,90±1,19 |
| EPA/ARA | 12,88±1,99 | 10,95±1,07 | 1,95±0,17 | 1,59±0,17 |
| DHA/EPA | 0,47±0,04 | 0,78±0,01 | 1,28±0,13 | 0,88±1,02 |
| n3/n6 | 8,45±2,17 | 8,08±0,13 | 1,96±0,25 | 1,94±0,37 |
| TOTAL | 1,98±0,12 | 2,43±0,11 | 7,74±0,52 | 17,84±1,42 |

VI. Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

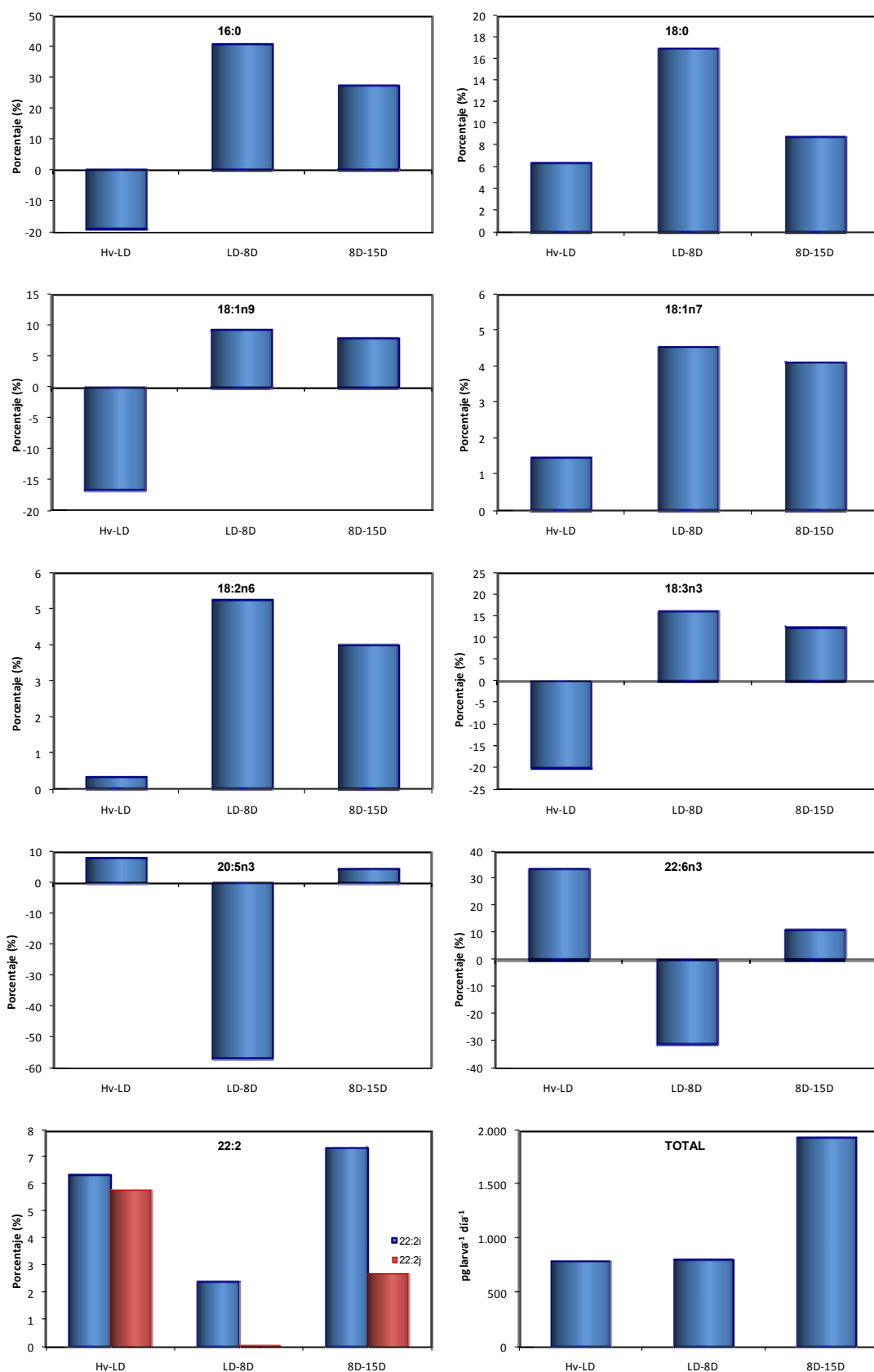


Fig. VI.19. Evolución de los ácidos grasos en los lípidos polares (LP) a lo largo del desarrollo larvario en *E. siliqua*. Hv-LD: paso de ovocito a larva D; LD-8D: paso de larva D a pediveliger; 8D-15D: paso de pediveliger a postlarva. TOTAL: variación diaria del contenido total entre estadios expresado en pg larva⁻¹ día⁻¹.

Cuando la pediveliger se transforma en postlarva, los ácidos grasos estructurales (polares) aumentan en su totalidad, representando las mayores contribuciones el palmítico (16:0), el α -linolénico (18:3n3) y el DHA, con aumentos porcentuales del 27, 12 y 11%, respectivamente.

Los ácidos grasos totales en los lípidos polares siguen una tendencia de incrementos, primero pequeños y en pediveliger y postlarva se producen aumentos importantes.

VI.4.5.- Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario del longueirón vello (*Solen marginatus*)

VI.4.5.1.- Lípidos neutros

El contenido total de ácidos grasos en los lípidos neutros en los ovocitos es de 30 ng ovocito⁻¹, cayendo en la fase de larva D veliger y de pediveliger, y aumentando sin alcanzar los valores iniciales en la postlarva recién fijada (Tabla VI.10). Éste es el comportamiento general de los ácidos grasos en los lípidos de reserva en *S. marginatus*.

En los AGS el principal ácido graso es el palmítico (16:0), seguido por el mirístico (14:0). En los AGS hay descensos paulatinos desde ovocito hasta pediveliger y un aumento en la postlarva (día 8), en el que no se alcanzan los valores iniciales.

Por orden de importancia, los AGMI mayoritarios son el palmitoleico (16:1n7), oleico (18:1n9) y 18:1n7. Los tres siguen una tendencia descendente hasta la pediveliger (5 días), aumentando en la fijación (8 días) hasta casi alcanzar los valores iniciales.

El EPA es el principal ácido graso en los AGPI de los lípidos neutros, seguido por el DHA, que representa un tercio del valor de este ácido graso en los ovocitos. En la larva D veliger se observa una pequeña reducción para, a continuación, caer bruscamente y recuperar valores próximos a los iniciales en la postlarva.

Los AGNMI están presentes en cantidades relativamente elevadas, siendo predominante el 22:2 frente al 20:2, y el isómero i sobre el j. Ambos ácidos grasos

aumentan ligeramente en el paso de ovocito a larva D, descendiendo en la pediveliger e incrementándose en la postlarva recién fijada.

Tabla VI.10. Composición de ácidos grasos en la fracción de lípidos neutros en *S. marginatus* a lo largo del desarrollo larvario. Valores expresados en ng individuo⁻¹ (n=4), como media±desviación estándar.

| | Ovocito | Larva D | 5 días | 8 días |
|----------------|------------|------------|------------|------------|
| 14:0 | 2,32±0,25 | 1,95±0,16 | 1,58±0,15 | 3,67±0,34 |
| 16:0 | 7,18±0,74 | 6,45±0,70 | 4,42±0,27 | 5,23±0,44 |
| 18:0 | 0,82±0,11 | 0,74±0,11 | 0,68±0,18 | 1,00±0,11 |
| 16:1n7 | 3,05±0,41 | 2,07±0,34 | 1,02±0,24 | 2,79±0,31 |
| 18:1n9 | 2,15±0,14 | 1,74±0,21 | 0,51±0,12 | 2,09±0,37 |
| 18:1n7 | 1,22±0,16 | 1,09±0,29 | 0,34±0,06 | 1,40±0,12 |
| 20:1n11 | 0,12±0,06 | 0,17±0,02 | 0,11±0,06 | 0,25±0,02 |
| 20:1n9 | 0,55±0,09 | 0,38±0,13 | 0,23±0,06 | 0,45±0,04 |
| 20:1n7 | 0,10±0,01 | 0,10±0,03 | 0,03±0,01 | 0,15±0,02 |
| 18:2n6 | 0,27±0,02 | 0,26±0,03 | 0,11±0,03 | 1,34±0,16 |
| 18:2n4 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,06±0,00 | 0,15±0,04 |
| 18:3n6 | 0,03±0,01 | 0,03±0,01 | 0,02±0,00 | 0,09±0,00 |
| 18:3n3 | 0,28±0,10 | 0,22±0,07 | 0,07±0,01 | 1,25±0,15 |
| 18:4n3 | 0,00±0,00 | 0,00±0,00 | 0,11±0,02 | 1,19±0,22 |
| 20:2i | 0,43±0,04 | 0,45±0,11 | 0,14±0,02 | 0,26±0,02 |
| 20:2j | 0,18±0,02 | 0,27±0,04 | 0,07±0,01 | 0,15±0,02 |
| 20:2n6 | 0,32±0,03 | 0,40±0,08 | 0,18±0,00 | 0,44±0,05 |
| 20:3n6 | 0,03±0,00 | 0,04±0,02 | 0,01±0,00 | 0,03±0,01 |
| ARA | 0,03±0,00 | 0,03±0,01 | 0,01±0,00 | 0,03±0,01 |
| 20:4n3 | 0,13±0,05 | 0,11±0,01 | 0,06±0,00 | 0,07±0,01 |
| EPA | 2,42±0,34 | 2,17±0,22 | 0,37±0,03 | 1,27±0,14 |
| 21:4n6 | 0,07±0,03 | 0,07±0,02 | 0,09±0,01 | 0,32±0,00 |
| 21:5n3 | 0,31±0,03 | 0,25±0,10 | 0,16±0,01 | 0,22±0,04 |
| 22:2i | 0,47±0,10 | 0,57±0,08 | 0,34±0,02 | 0,60±0,05 |
| 22:2j | 0,30±0,08 | 0,30±0,03 | 0,12±0,02 | 0,12±0,03 |
| 22:4n6 | 0,18±0,01 | 0,11±0,02 | 0,05±0,01 | 0,14±0,01 |
| 22:5n6 | 0,00±0,00 | 0,05±0,03 | 0,03±0,00 | 0,15±0,09 |
| 22:5n3 | 0,36±0,05 | 0,35±0,04 | 0,21±0,02 | 0,24±0,05 |
| DHA | 0,85±0,07 | 0,81±0,04 | 0,46±0,03 | 0,69±0,03 |
| AGS | 10,32±1,59 | 8,96±0,96 | 7,16±0,74 | 9,90±0,58 |
| AGMI | 5,86±0,48 | 3,49±0,21 | 1,72±0,14 | 5,64±0,53 |
| n9 | 2,09±0,28 | 1,00±0,17 | 0,43±0,03 | 2,00±0,33 |
| n7 | 4,37±0,85 | 2,82±0,35 | 1,29±0,07 | 4,31±0,43 |
| AGPI | 5,18±0,30 | 6,32±0,45 | 1,46±0,15 | 6,77±0,81 |
| n6 | 0,84±0,08 | 0,96±0,10 | 0,42±0,07 | 1,98±0,23 |
| n3 | 4,35±0,83 | 5,36±0,26 | 1,01±0,39 | 4,68±0,24 |
| EPA/ARA | 93,59±6,86 | 73,26±8,55 | 41,18±5,18 | 53,54±4,22 |
| DHA/EPA | 0,35±0,01 | 0,37±0,01 | 1,33±0,21 | 0,66±0,10 |
| n3/n6 | 5,56±0,90 | 5,55±0,76 | 2,43±0,30 | 2,52±0,29 |
| TOTAL | 29,73±2,79 | 20,60±3,58 | 10,65±0,83 | 23,77±0,30 |

En los ovocitos los AGS son los más abundantes, representando el 50% del total, repartiéndose a partes iguales el resto de los AGMI y AGPI. Los AGS y AGMI disminuyen paulatinamente hasta la pediveliger, para en la fijación aumentar hasta casi los valores del ovocito. Por el contrario, los AGPI aumentan ligeramente en la larva D y descienden bruscamente en la pediveliger, para a continuación terminar el desarrollo larvario con valores ligeramente superiores a los presentes en la larva D veliger.

Los ácidos grasos totales siguen la misma tendencia que los AGS y AGMI, con descensos hasta pediveliger y aumentos en la postlarva, que se acercan a las cantidades iniciales del ovocito.

Como era de esperar, después de los datos presentados arriba, los saldos netos del paso de ovocito a larva D y de este estadio a pediveliger, se cierran con pérdidas de entre 9.000 y 10.000 pg de ácidos grasos por individuo, recuperando gran parte de esta pérdida al final del desarrollo larvario, pero aproximándose a los valores presentes en el ovocito. Esto representa, analizándolo por individuo y día, que la mayor pérdida se produce en el desarrollo embrionario hasta larva D, mientras que en el paso de larva D a pediveliger (5 días), se pierden $2.487 \text{ pg individuo}^{-1} \text{ día}^{-1}$ (Fig. VI.20).

En esta figura se observa que en la primera transición las pérdidas mayores son para el palmítico (16:0), que representa un 21% de las pérdidas, y la mayor ganancia para el 22:2i.

En el paso de larva D a pediveliger, el palmítico (16:0) y el EPA soportan la mayor parte del descenso.

En la transición de pediveliger a postlarva sólo hay aumentos de los distintos ácidos grasos. Las mayores subidas son para el AGS esteárico (18:0) y los AGMI, 18:1n7 y oleico (18:1n9).

VI. Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

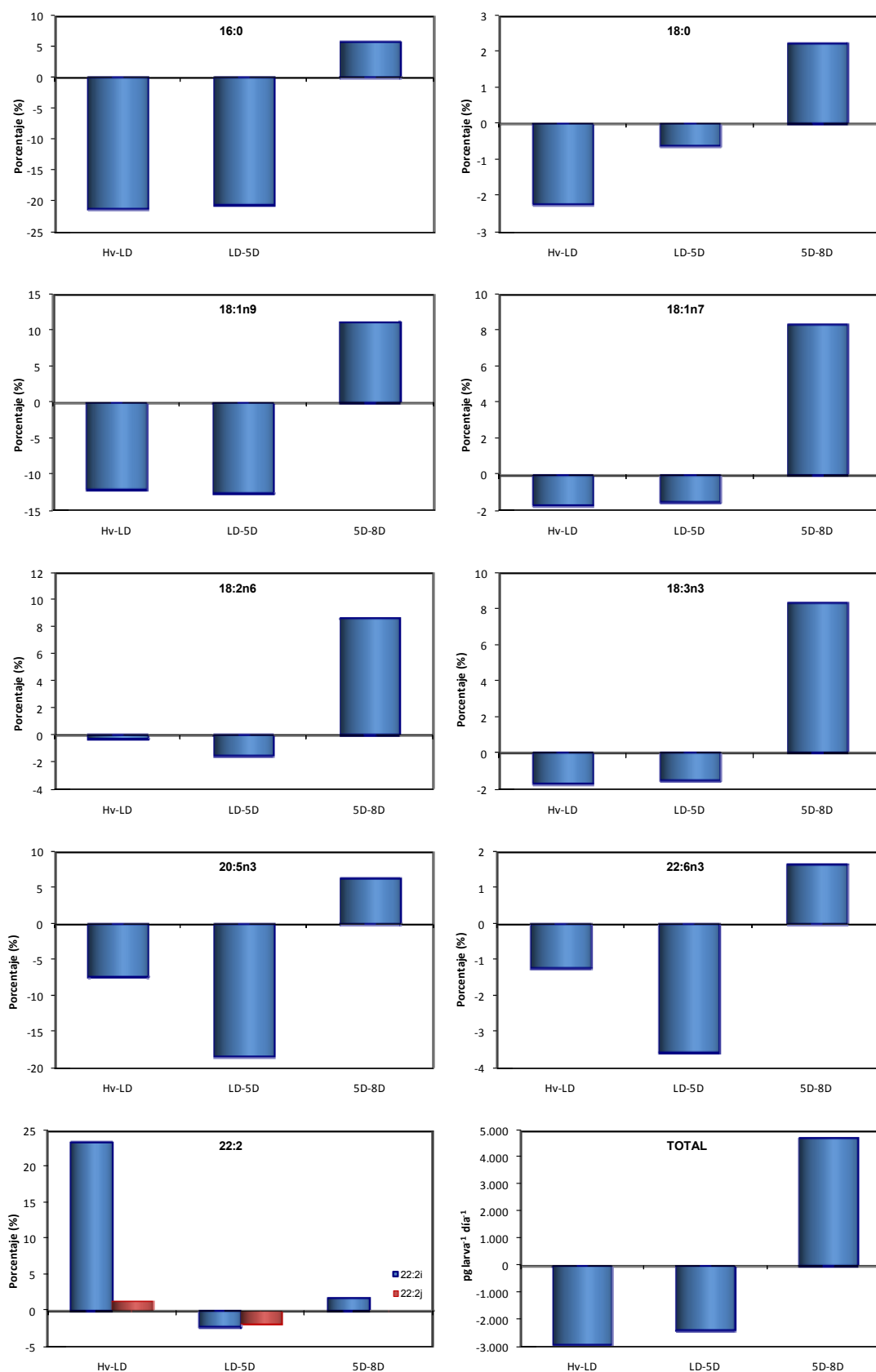


Fig. VI.20. Evolución de los ácidos grasos en los lípidos neutros (LN) a lo largo del desarrollo larvario en *S. marginatus*. Hv-LD: paso de ovocito a larva D; LD-5D: paso de larva D a pediveliger; 5D-8D: paso de pediveliger a postlarva. TOTAL: variación diaria del contenido total entre estadios, expresado en $\text{pg larva}^{-1} \text{ día}^{-1}$.

VI.4.5.2.- Lípidos polares

El ácido palmítico (16:0) es el mayoritario en los AGS de los lípidos polares (Tabla VI.11). En el paso de ovocito a larva D se mantiene estable, mientras que el esteárico (18:0) desciende y, a partir de este estadio, comienzan ambos a aumentar hasta la fijación.

En los AGMI los ácidos grasos principales son el oleico (18:1n9) y el 18:1n7, seguidos del palmitoleico (16:1n7). Los dos primeros permanecen estables hasta los 5 días (pediveliger), aumentando en la postlarva. El ácido palmitoleico muestra los mismos valores en el ovocito y larva D, disminuyendo su cantidad en la pediveliger y aumentando en la postlarva hasta los valores presentes en el ovocito.

En los AGPI el EPA es mayoritario en ovocitos, seguido con aproximadamente un tercio de la cantidad presente por el DHA y el 22:5n3. El EPA disminuye su contenido en la larva D, y a partir de ahí sufre reducciones mucho más importantes hasta el final del desarrollo larvario. El DHA y el 22:5n3 mantienen sus valores en la larva D, y posteriormente el DHA desciende hasta la fijación, mientras el 22:5n3 baja en la pediveliger y se recupera parcialmente en la postlarva.

El ácido graso 22:2 del grupo de los AGNMI, describe un comportamiento con valores constantes en el ovocito, larva D y postlarva, con un valle en la pediveliger.

En los ovocitos y larvas D, los AGPI son la fracción predominante seguidos por los AGS. Pero en la pediveliger y postlarva (8 días) el orden se invierte, siendo mayoritarios los AGS seguidos por los AGPI.

Los ácidos grasos totales en el ovocito son de 7,9 ng individuo⁻¹, manteniéndose constantes en la larva D, descendiendo en la pediveliger y aumentando hasta casi los valores iniciales en la postlarva recién fijada.

Como se observa en la figura VI.21, en el paso de ovocito a larva D, hay una pequeña reducción en el balance total de ácidos grasos estudiados, con una fuerte reducción en el paso de larva D a pediveliger y un aumento en el paso de esta última

fase a postlarva. El ácido graso que más aporta al total del descenso es el EPA con 53%, y junto al esteárico (18:0) y el α -linolénico (18:3n3) soportan el 87% de la reducción en la primera fase estudiada.

Tabla VI.11. Composición de ácidos grasos en la fracción de lípidos polares en *S. marginatus* a lo largo del desarrollo larvario. Valores expresados en ng individuo⁻¹ (n=4), como media±desviación estándar.

| | Ovocito | Larva D | 5 días | 8 días |
|----------------|------------|------------|------------|-----------|
| 14:0 | 0,06±0,01 | 0,05±0,00 | 0,16±0,01 | 0,13±0,04 |
| 16:0 | 0,94±0,09 | 1,02±0,30 | 1,84±0,06 | 3,27±0,36 |
| 18:0 | 0,70±0,10 | 0,55±0,09 | 1,15±0,14 | 1,76±0,13 |
| 16:1n7 | 0,29±0,05 | 0,31±0,03 | 0,07±0,03 | 0,35±0,03 |
| 18:1n9 | 0,37±0,02 | 0,34±0,01 | 0,36±0,01 | 0,71±0,03 |
| 18:1n7 | 0,25±0,04 | 0,23±0,02 | 0,28±0,00 | 0,77±0,00 |
| 20:1n11 | 0,06±0,01 | 0,05±0,01 | 0,08±0,00 | 0,04±0,02 |
| 20:1n9 | 0,22±0,03 | 0,21±0,03 | 0,09±0,00 | 0,10±0,02 |
| 20:1n7 | 0,02±0,00 | 0,04±0,02 | 0,07±0,00 | 0,37±0,01 |
| 18:2n6 | 0,07±0,02 | 0,05±0,00 | 0,09±0,00 | 0,13±0,04 |
| 18:2n4 | 0,02±0,01 | 0,03±0,00 | 0,05±0,01 | 0,00±0,00 |
| 18:3n6 | 0,01±0,00 | 0,01±0,00 | 0,02±0,00 | 0,00±0,00 |
| 18:3n3 | 0,34±0,08 | 0,19±0,03 | 0,46±0,07 | 1,11±0,20 |
| 18:4n3 | 0,01±0,00 | 0,15±0,00 | 0,11±0,01 | 0,12±0,00 |
| 20:2i | 0,16±0,02 | 0,16±0,01 | 0,12±0,03 | 0,29±0,01 |
| 20:2j | 0,09±0,01 | 0,10±0,00 | 0,04±0,01 | 0,05±0,01 |
| 20:2n6 | 0,17±0,03 | 0,16±0,00 | 0,23±0,01 | 0,14±0,04 |
| 20:3n6 | 0,03±0,01 | 0,02±0,00 | 0,04±0,00 | 0,00±0,00 |
| ARA | 0,05±0,00 | 0,04±0,00 | 0,04±0,01 | 0,00±0,00 |
| 20:4n3 | 0,10±0,02 | 0,09±0,02 | 0,07±0,04 | 0,07±0,02 |
| EPA | 2,19±0,18 | 1,71±0,15 | 0,25±0,04 | 0,17±0,02 |
| 21:4n6 | 0,02±0,00 | 0,04±0,04 | 0,06±0,02 | 0,14±0,05 |
| 21:5n3 | 0,20±0,05 | 0,26±0,07 | 0,17±0,07 | 0,21±0,05 |
| 22:2i | 0,40±0,05 | 0,45±0,09 | 0,28±0,06 | 0,45±0,01 |
| 22:2j | 0,21±0,03 | 0,27±0,07 | 0,16±0,00 | 0,28±0,02 |
| 22:4n6 | 0,27±0,05 | 0,34±0,12 | 0,31±0,03 | 0,00±0,00 |
| 22:5n6 | 0,02±0,01 | 0,00±0,00 | 0,02±0,01 | 0,34±0,02 |
| 22:5n3 | 0,54±0,06 | 0,61±0,08 | 0,16±0,00 | 0,33±0,02 |
| DHA | 0,79±0,06 | 0,89±0,05 | 0,35±0,05 | 0,08±0,02 |
| AGS | 1,90±0,32 | 1,76±0,16 | 3,11±0,15 | 4,31±0,55 |
| AGMI | 1,21±0,23 | 1,19±0,00 | 0,80±0,17 | 2,35±0,03 |
| n9 | 0,58±0,13 | 0,54±0,02 | 0,47±0,01 | 0,82±0,01 |
| n7 | 0,56±0,09 | 0,59±0,01 | 0,38±0,08 | 1,49±0,03 |
| AGPI | 4,79±0,48 | 4,52±0,01 | 1,17±0,23 | 3,73±0,39 |
| n6 | 0,62±0,12 | 0,67±0,15 | 0,13±0,00 | 0,83±0,03 |
| n3 | 4,16±0,35 | 3,81±0,17 | 1,37±0,10 | 2,03±0,26 |
| EPA/ARA | 48,51±4,63 | 38,54±3,36 | 6,70±0,00 | - |
| DHA/EPA | 0,36±0,01 | 0,52±0,02 | 1,55±0,10 | 0,38±0,00 |
| n3/n6 | 6,69±0,11 | 5,85±1,55 | 10,12±0,10 | 0,00±0,00 |
| TOTAL | 7,90±0,53 | 7,56±0,06 | 4,56±0,02 | 6,68±0,34 |

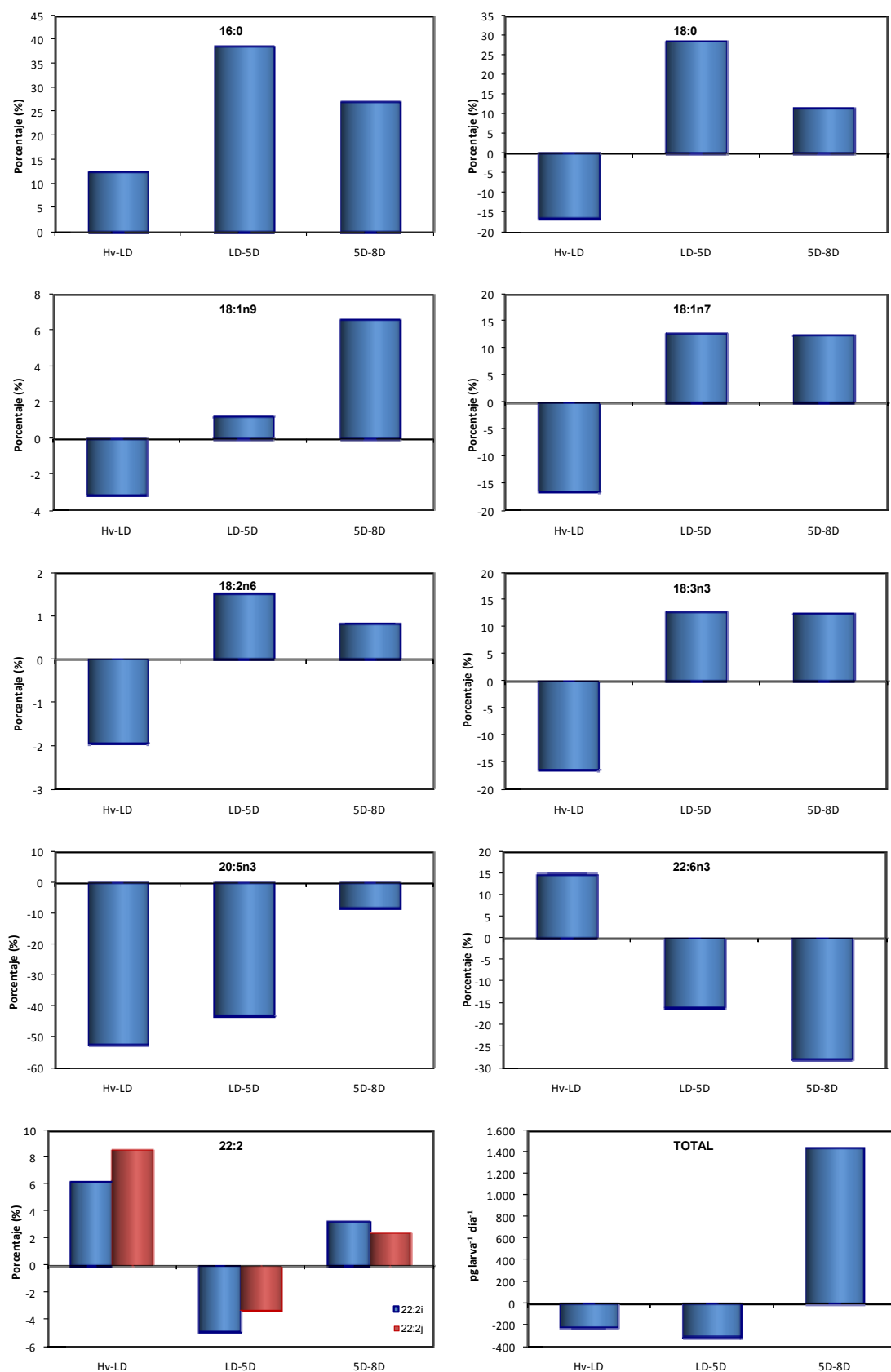


Fig. VI.21. Evolución de los ácidos grasos en los lípidos polares (LP) a lo largo del desarrollo larvario en *S. marginatus*. Hv-LD: paso de ovocito a larva D; LD-5D: paso de larva D a pediveliger; 5D-8D: paso de pediveliger a postlarva. TOTAL: variación diaria del contenido total entre estadios, expresado en pg larva⁻¹ día⁻¹.

En la fase de larva D a pediveliger la reducción total es mucho más importante y se explica prácticamente por la reducción de los siguientes AGPI: EPA, DHA y 22:5n3. Aunque el saldo neto en esta fase es negativo, hay ácidos grasos que aumentan en este período de estudio, como son el ácido palmítico (16:0) y el esteárico (18:0).

En el paso a postlarva se produce un aumento de los ácidos grasos totales, con un 27% de incremento del ácido palmítico (16:0), un 12% del esteárico (18:0) y el mismo porcentaje para el α -linolénico (18:3n3). En esta fase también hay descensos en algunos ácidos grasos, como son el DHA y el EPA.

VI.4.6.- Comparativa de las evoluciones durante el desarrollo larvario entre especies

VI.4.6.1.- Lípidos neutros

En la figura IV.22 se pueden observar las evoluciones de las ganancias y pérdidas de los ácidos grasos más representativos y del total entre estadios en los lípidos neutros. El ácido palmítico (16:0) se consume en el paso de ovocito a larva D de una forma importante en *E. siliqua* y *S. marginatus*, mientras en el paso de larva D a pediveliger, sólo desciende en *S. marginatus* con un porcentaje similar al estadio anterior. En el resto se observan ganancias.

En *S. marginatus* se observan también descensos en las reservas de ácido esteárico (18:0) en el paso de ovocito a larva D y de ésta a pediveliger, aunque son ligeros. Los principales incrementos se observan en *E. arcuatus*.

En el 18:1n7 y el ácido oleico (18:1n9) se observan descensos en *S. marginatus* en las dos primeras fases estudiadas, y hasta larva D en *E. siliqua*.

El ácido linoleico desciende en *E. siliqua* de ovocito a larva D y en *S. marginatus* de larva D a pediveliger, incrementándose en el resto, con contribuciones entre el 8 y el 15%.

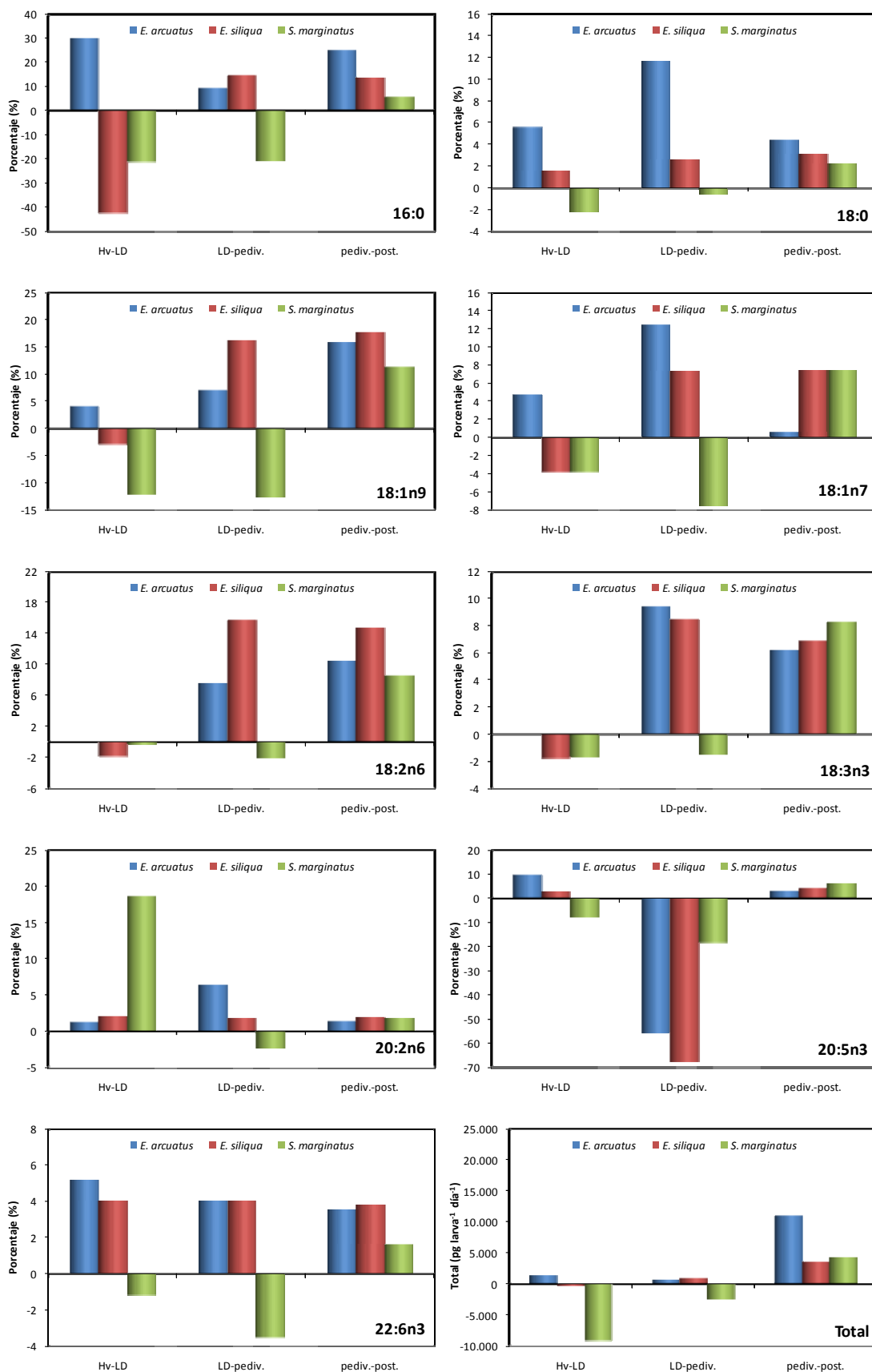


Fig. VI.22. Evolución de los ácidos grasos en los lípidos neutros (LN) a lo largo del desarrollo larvario de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*. TOTAL: variación diaria del contenido total entre estadios, expresado en pg larva⁻¹ día⁻¹.

El 18:3n3 o ácido α -linolénico desciende en *E. siliqua* y *S. marginatus* hasta larva D, mientras *E. arcuatus* prácticamente se mantiene. En *S. marginatus* de larva D a pediveliger cae de nuevo. Por el contrario, las otras dos especies en esta fase y las tres en la siguiente, se incrementan contribuyendo entre el 6 y el 9% de las ganancias.

De ovocito a larva D el 20:2n6 contribuye al incremento de ácidos grasos en *S. marginatus* con un 18,6% del total, aunque en esta fase se produce un descenso de AGT. Sin embargo, de larva D a pediveliger este ácido graso disminuye contribuyendo en un 2,3% al total del descenso. En el paso de pediveliger a postlarva en las tres especies aumenta del mismo modo.

En la transición de ovocito a larva D en *S. marginatus*, el EPA disminuye representando un 7% del total de pérdidas en esta fase, mientras en las dos especies de *Ensis* se produjo un acumulo de este ácido graso. En la siguiente fase, de larva D a pediveliger, el EPA soporta descensos importantes en *E. arcuatus* (56%) y *E. siliqua* (68%), y algo más moderado en *S. marginatus*, con una bajada del 18%. En el paso a postlarva contribuye con incrementos moderados en las tres especies.

El DHA disminuye en *S. marginatus* hasta pediveliger, mientras se acumula en estas dos fases en *Ensis*, y en el paso de pediveliger a postlarva en las tres especies.

El total de variación en lípidos neutros por individuo y por día, desciende entre ovocito y larva D en *E. siliqua* y *S. marginatus*, aunque el descenso en la primera especie es muy ligero. Entre larva D y pediveliger el descenso en *S. marginatus* es similar al de la fase anterior, disminuyendo 2.487 pg individuo⁻¹ día⁻¹, correspondiéndose con un período mixotrófico. En *E. arcuatus* no se observa el período mixotrófico, ya que va desde la larva D hasta la larva veliger de 8 días. Entre pediveliger y postlarva las tres especies acumulan lípidos neutros, siendo *E. arcuatus* la que almacena mayores reservas con aproximadamente 11.040 pg individuo⁻¹ día⁻¹.

VI.4.6.2.- Lípidos polares

En la figura IV.23 se pueden observar las evoluciones (ganancias y pérdidas) de los ácidos grasos más representativos y del total, entre estadios, en los lípidos polares.

El ácido palmítico se acumula en *E. arcuatus* y *S. marginatus* en el paso de ovocito a larva D, mientras se pierde en *E. siliqua*. Este ácido graso aumenta mucho en el paso de larva D a pediveliger en *E. siliqua* y *S. marginatus*, y de pediveliger a postlarva en las tres especies.

El ácido esteárico (18:0) se acumula en todas las fases estudiadas y en todas las especies, a excepción del descenso que se produce en *S. marginatus* de ovocito a larva D.

El ácido oleico (18:1n9) se gasta en el paso de ovocito a larva D en *E. siliqua* y *S. marginatus*. En la transición a pediveliger desde larva D se almacena en todas las especies, si bien en *S. marginatus* la contribución de este ácido graso al total de ganancias es tan sólo del 1,2%. En *E. arcuatus*, de pediveliger a postlarva, representa el 29% de los ácidos grasos que disminuyen.

El 18:1n7 desciende en el paso hasta larva D en *S. marginatus*, aunque sólo representa un 1,2% del descenso total de ácidos grasos. En esta especie, en el paso de pediveliger a postlarva, representa el 9% del incremento en esta fase. En las especies de *E. siliqua* se acumula en todas las fases estudiadas, aunque más en las dos últimas fases estudiadas, mientras en *E. arcuatus* contribuye al incremento de ácidos grasos en las dos primeras fases estudiadas, y de pediveliger a postlarva disminuye.

El 18:2n6 o ácido linoleico se pierde en las membranas durante la embriogénesis hasta larva D en *S. marginatus*, mientras en esta fase las dos *Ensis* se mantienen en los mismos valores que en el ovocito. En las restantes fases del desarrollo larvario se almacena en las membranas.

El ácido α -linolénico o 18:3n3 se consume en los lípidos estructurales o de membrana hasta que se forma la larva D en las tres especies, representando el 17-20% de las pérdidas totales durante la embriogénesis. En las dos siguientes fases estudiadas se almacena en las membranas, aunque en *E. arcuatus* el porcentaje de incremento es menor que en las otras dos especies.

VI. Composición de ácidos grasos en el desarrollo larvario

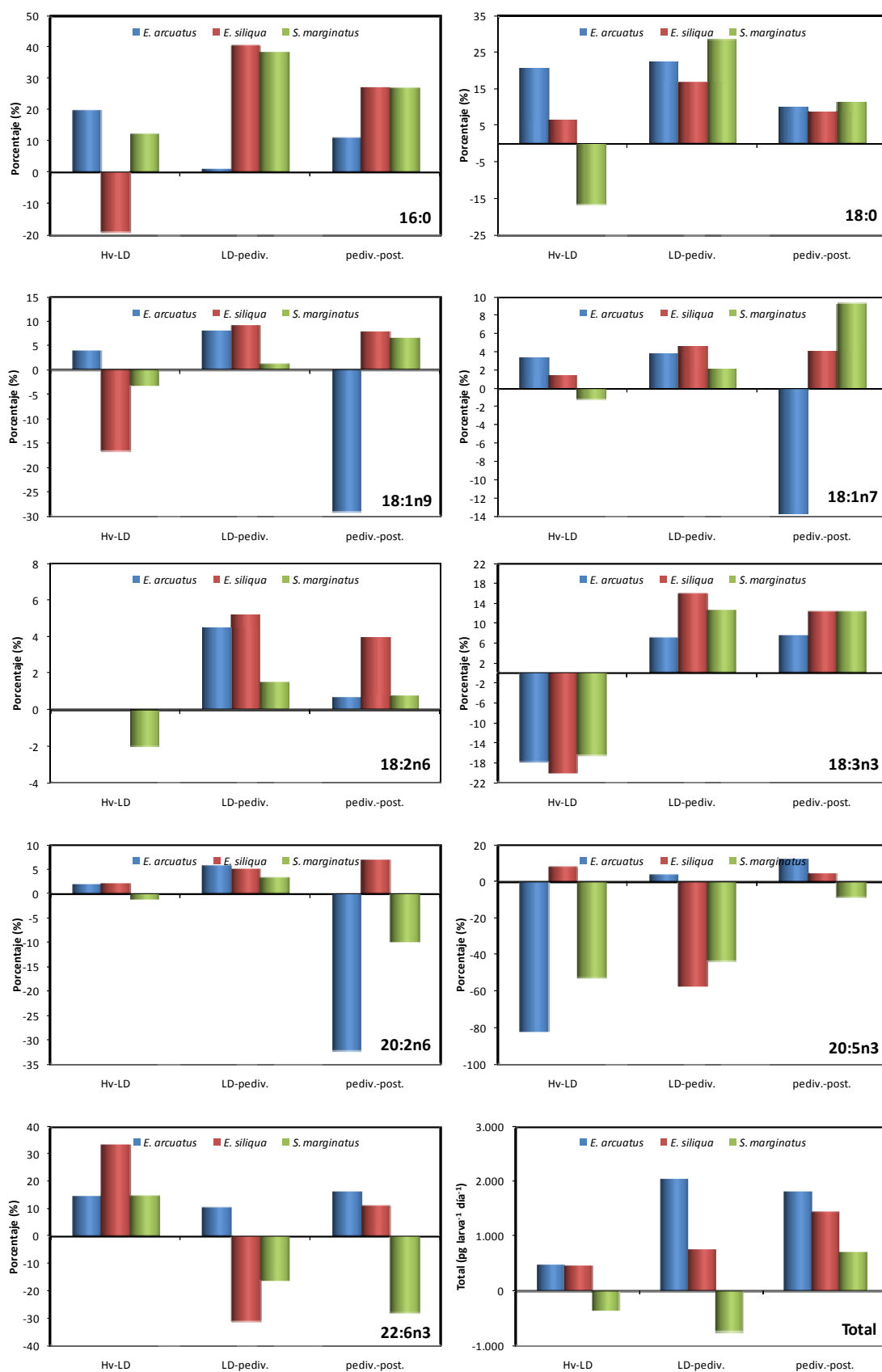


Fig. VI.23. Evolución de los ácidos grasos en los lípidos polares (LP) a lo largo del desarrollo larvario de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*. TOTAL: variación diaria del contenido total entre estadios expresado en pg larva⁻¹ día⁻¹.

En las dos especies de *Ensis* en las dos primeras transiciones estudiadas, el 20:2n6 contribuye con incrementos entre el 2 y el 5% al total del almacenamiento. En *S. marginatus* este ácido graso disminuye en las membranas de ovocito a larva D y de pediveliger a postlarva.

En los lípidos polares, del mismo modo que en los neutros, el EPA es el ácido graso que soporta descensos más fuertes. Durante la embriogénesis *E. arcuatus* soporta el 82% del descenso de ácidos grasos en esta fase, mientras *S. marginatus* desciende un 52%. De larva D a pediveliger se observan caídas importantes en *E. siliqua* y *S. marginatus* y en el paso de pediveliger a postlarva sólo disminuye *S. marginatus*.

El ácido docosahexaenoico o DHA aumenta su proporción en las membranas de las larvas D, con respecto al ovocito, de una forma similar en *E. arcuatus* y *S. marginatus*, y prácticamente dobla los valores de las otras dos especies en *E. siliqua*. Sin embargo, en la evolución de larva D a pediveliger *E. siliqua* presenta un descenso, que se corresponde con un 31% del total de pérdidas, y éste representa aproximadamente la mitad en *S. marginatus*. En la transición de pediveliger a postlarva disminuye el DHA en las membranas de *S. marginatus*, y aumenta en las dos especies de *Ensis*.

En el total de lípidos polares o de membrana por individuo en el paso de ovocito a larva D, se almacenan aproximadamente 450 pg individuo⁻¹ día⁻¹ en las dos *Ensis*, mientras se pierde una cantidad similar en *S. marginatus*. Hasta pediveliger, desde la larva D en *S. marginatus*, se vuelve a observar otro descenso. En el paso de pediveliger a postlarva se almacenan lípidos estructurales en las tres especies, si bien, los mayores incrementos se observan en *E. arcuatus*.

VI.5.- DISCUSIÓN

Alimentación

La composición en ácidos grasos de la mezcla microalgal, está determinada por las especies utilizadas (*Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* y *Chaetoceros calcitrans*) y por las condiciones en las que se cultivan en el criadero. Así, la variabilidad de la composición en ácidos grasos entre las mismas especies se ve afectada por las condiciones del cultivo, referidas a la temperatura y a la intensidad luminosa (Mortensen *et al.*, 1988; James *et al.*, 1989; Sukenik *et al.*, 1989, Ojea *et al.*, 1999) o por la fase de crecimiento en que se encuentre el cultivo (exponencial o estacionario) (De Pauw & Persoone, 1988; Brown *et al.*, 1989). Se obtuvieron cantidades importantes en 14:0, 16:0 y 18:1n9, aportado por *T. suecica* (Fernández-Reiriz *et al.*, 1989); de 18:4n3, suministrado por *T-Isochrysis* (Volkman *et al.*, 1989; Napolitano *et al.*, 1990; Delaunay, 1992; Soudant, 1995); y de 20:5n3 y 22:6n3, provenientes de *P. lutheri* (Volkman *et al.*, 1989; Delaunay, 1992; Soudant, 1995).

Estadios larvarios

Con el fin de comparar los datos obtenidos con los de otras especies, en la tabla VI.12 se exponen los datos medios de las tallas, pesos secos, cantidad de ácidos grasos totales, así como de las fracciones de lípidos neutros y polares de los distintos estadios estudiados de las tres especies de solénidos, de *Venerupis pullastra* (Nóvoa, 2007) y de *Pecten maximus* (Soudant, 1995).

La calidad del ovocito va a ser un factor determinante en su paso a larva D, al ser un período de vida lecitotrófica o de no alimentación. Como vimos en los resultados, la composición en ácidos grasos de los ovocitos es distinta entre las especies, por lo que esta variación puede definirnos distintas estrategias en el paso de ovocito a larva D.

El tamaño de los **ovocitos** podría estar relacionado con el contenido total de reservas (LN). Los ovocitos de *S. marginatus* miden entre 143-154 µm, presentando una envuelta coriónica y almacenando una gota lipídica en su interior, por lo que su cantidad de ácidos grasos en esta fracción lipídica es elevada (29,73 ng ovocito⁻¹). Las dos especies de *Ensis* presentan tamaños más pequeños que *Solen* (71-90 y 77-89 µm en

E. arcuatus y *E. siliqua*, respectivamente), siendo sus contenidos en ácidos grasos más bajos (5,9 y 5,4 ng ovocito⁻¹, respectivamente). Sin embargo, a tamaños semejantes con otras especies de bivalvos, *Ensis* contiene mayor cantidad de ácidos grasos que *V. pullastra*, que sólo presenta 1,8-2,8 ng ovocito⁻¹ (Nóvoa, 2007), *Ruditapes decussatus* 1,6 ng ovocito⁻¹ (Martínez *et al.*, 2002) y *P. maximus* 4,6 ng ovocito⁻¹ (Soudant, 1995).

Tabla VI.12. Datos medios de talla (μm), pesos secos (P.S.; $\mu\text{g ind.}^{-1}$), cantidad de ácidos grasos totales (ng ind.⁻¹) y de lípidos neutros y polares (ng ind.⁻¹ y porcentajes) de ovocitos, larvas *D veliger*, larvas *veliger*, *pediveliger* y postlarvas. Datos de *Venerupis pullastra* tomados de Nóvoa (2007) y de *Pecten maximus* de Soudant (1995).

| | | <i>E. arcuatus</i> | <i>E. siliqua</i> | <i>S. marginatus</i> | <i>V. pullastra</i> | <i>P. maximus</i> |
|-----------------|----------------------------------|--------------------|-------------------|----------------------|---------------------|-------------------|
| Días | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ovocito | Talla (μm) | 80,6 | 82,7 | 148,7 | 76 | 69-72 |
| | P.S. ($\mu\text{g ind.}^{-1}$) | 0,137 | 0,165 | 0,565 | 0,028 | - |
| | ng AGTs LN | 5,95 | 5,40 | 29,73 | 1,983 | 4,638 |
| | ng AGTs LP | 1,17 | 1,98 | 7,90 | 0,793 | 1,142 |
| | Tot. AG | 7,12 | 7,38 | 37,63 | 2,776 | 5,780 |
| | % LN | 83,56 | 73,17 | 79,01 | 71,44 | 78,11 |
| | % LP | 16,44 | 26,83 | 20,99 | 28,56 | 21,89 |
| Días | | 1 | 1 | 1 | 2 | 2 |
| Larva D Veliger | Talla (μm) | 121,5 | 130,8 | 165,9 | 115 | 107 |
| | P.S. ($\mu\text{g ind.}^{-1}$) | 0,355 | 0,255 | 0,525 | 0,075 | - |
| | ng AGTs LN | 7,32 | 5,18 | 20,60 | 2,161 | 3,263 |
| | ng AGTs LP | 1,93 | 2,43 | 7,56 | 0,862 | 1,517 |
| | Tot. AG | 9,25 | 7,61 | 28,16 | 3,023 | 4,780 |
| | % LN | 79,14 | 68,07 | 73,15 | 71,49 | 65,41 |
| | % LP | 20,86 | 31,93 | 26,85 | 28,51 | 34,59 |
| Días | | 8 | | | 7 | 5 |
| Larva Veliger | Talla (μm) | 186,6 | | | 152 | 120 |
| | P.S. ($\mu\text{g ind.}^{-1}$) | 1,040 | | | 0,53 | - |
| | ng AGTs LN | 6,13 | | | 2,53 | 0,60 |
| | ng AGTs LP | 4,62 | | | 2,95 | 1,14 |
| | Tot. AG | 10,75 | | | 5,48 | 1,74 |
| | % LN | 57,02 | | | 46,17 | 34,48 |
| | % LP | 42,98 | | | 53,83 | 65,52 |
| Días | | 15 | 8 | 5-6 | 15 | 19 |
| Pediveliger | Talla (μm) | 281,5 | 221,7 | 233,1 | 238 | 195 |
| | P.S. ($\mu\text{g ind.}^{-1}$) | 2,713 | 1,615 | 1,311 | 1,630 | - |
| | ng AGTs LN | 19,83 | 11,49 | 10,65 | 5,555 | 15,648 |
| | ng AGTs LP | 25,16 | 7,74 | 4,56 | 8,333 | 4,932 |
| | Tot. AG | 44,99 | 19,23 | 15,21 | 13,888 | 20,580 |
| | % LN | 44,08 | 59,75 | 70,02 | 40,00 | 72,69 |
| | % LP | 55,92 | 40,25 | 29,98 | 60,00 | 27,31 |
| Días | | 20 | 15 | 8-9 | 28 | 23 |
| Postlarva | Talla (μm) | 353,6 | 331,5 | 286,0 | 534 | 215 |
| | P.S. ($\mu\text{g ind.}^{-1}$) | 5,018 | 3,325 | 2,168 | 9,750 | - |
| | ng AGTs LN | 71,79 | 36,87 | 23,77 | 13,141 | 16,102 |
| | ng AGTs LP | 40,38 | 17,84 | 6,68 | 15,631 | 5,426 |
| | Tot. AG | 112,17 | 54,71 | 30,45 | 28,772 | 21,528 |
| | % LN | 64,00 | 67,39 | 78,06 | 45,67 | 72,69 |
| | % LP | 36,00 | 32,61 | 21,94 | 54,33 | 27,31 |

Esta mayor talla de los ovocitos también influye en el mayor contenido en ácidos grasos en LP, ya que provoca que exista una mayor superficie de membrana. *S. marginatus* presenta en sus ovocitos las características anteriormente citadas y, por lo tanto, una elevada cantidad de ácidos grasos en los lípidos polares (7,9 ng ovocito⁻¹). Se encontraron valores menores en *E. arcuatus* y *E. siliqua* (1,17 y 1,98 ng ovocito⁻¹, respectivamente), comparables con los obtenidos por Soudant (1995) para *P. maximus* (1,1 ng ovocito⁻¹).

Las diferencias de tamaño de las **larvas D** entre las dos especies de *Ensis* y *S. marginatus* no son tan evidentes, pero sí lo sigue siendo su cantidad de ácidos grasos en LN (7,3; 5,2 y 20,6 ng individuo⁻¹ en *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*, respectivamente). Entre las dos especies de *Ensis*, a talla similar, presentan pesos secos diferentes y esto se traduce en una mayor cantidad de ácidos grasos en *E. arcuatus*. De cualquier forma, las tres especies de solénidos, presentan mayores contenidos en ácidos grasos que *V. pullastra* (2,2 ng individuo⁻¹). Dentro de esta fracción, destaca el elevado contenido en AGS en *S. marginatus*, con una función energética, lo que podría explicar su estrategia, en la que estos ácidos grasos le permiten un rápido desarrollo larvario y una alta supervivencia.

En los LP *E. arcuatus* y *E. siliqua* presentan pequeñas diferencias en el contenido total de ácidos grasos en sus larvas D, 1,9 y 2,4 ng individuo⁻¹, respectivamente, y estos datos son comparables con los de *P. maximus* (Soudant, 1995). *S. marginatus* presenta cuatro veces más ácidos grasos en esta fracción que las especies de *Ensis*. En *S. marginatus* la talla de la larva D es mayor que en *Ensis*, pero éste puede no ser el único factor que explique el elevado contenido de LP, sino que aún los conserva del ovocito y los utiliza como almacén de reservas energéticas. Los AGPI en las tres especies de solénidos, así como en las dos especies objeto de comparación, son la familia mayoritaria.

En las **pediveliger** dentro de los LN se pueden establecer dos grupos, por una parte *E. siliqua* y *S. marginatus* (11 ng individuo⁻¹) y por la otra, *E. arcuatus* con 20 ng individuo⁻¹. Ésta última, es una especie que tarda más tiempo en alcanzar este estadio, con 15 días de cultivo, por lo que tiene más tiempo para acumular reservas a partir de la alimentación. Podríamos estar ante larvas magras, las del primer grupo y,

larvas grasas en el caso de *E. arcuatus*. Las dos primeras priorizan sus reservas en crecer como *V. pullastra*, mientras que en *E. arcuatus*, su prioridad es la de acumular reservas energéticas y tarda más en crecer, como en el caso de *P. maximus* (Nóvoa, 2007).

La cantidad total de ácidos grasos en las **postlarvas** de *E. arcuatus* vuelve a ser mayor, 112 ng individuo⁻¹ frente a 55 y 30 ng individuo⁻¹ de *E. siliqua* y *S. marginatus*, respectivamente. Estos datos están directamente relacionados con su mayor talla y peso seco.

Evoluciones

Los cambios producidos entre los distintos estadios (ovocito, larva D veliger, larva veliger, larva pediveliger y postlarva) no solamente van a ser morfológicos, sino que también existen cambios metabólicos a nivel lipídico (tabla VI.12), lo que conlleva a la diferenciación de dos etapas: la embriogénesis, de ovocito a larva D y el desarrollo larvario que abarca, de larva D a larva pediveliger y de larva pediveliger a postlarva.

En la **embriogénesis** (ovocito a larva D veliger) existe un incremento de LN en la especie *E. arcuatus*, que posiblemente se deba a una capacidad de biosíntesis de ácidos grasos saturados (16:0 y 18:0) y monoinsaturados (18:1n9), al aumentar su contenido y ésto, también parece suceder en *V. pullastra*. Podría existir en estas especies una biosíntesis “*de novo*” de ácidos grasos a partir de precursores no lipídicos y más sencillos del tipo acetil-CoA.

Sin embargo, en los lípidos neutros de *E. siliqua* y *S. marginatus* existen descensos en esta misma fase, siendo muy pronunciados en *S. marginatus*, correspondiéndose ésto más con la estrategia de *P. maximus*, es decir, con el consumo de energía. Por otra parte también se observa, como la energía necesaria para superar este período **lecitotrófico** (sin alimentación exógena) en estas dos especies de solénidos y en *P. maximus* prácticamente se soporta con los mismos ácidos grasos (16:0, 14:0, 16:1n7, 18:1n9 y EPA).

Con relación a los LP, *E. arcuatus* soporta el paso a larva D, con el consumo de EPA y en menor medida del 18:3n3 pero, sin embargo, vuelven a aumentar el 18:0, 16:0 y el DHA. Por lo tanto, nuevamente, como ocurrió con la fracción de lípidos neutros, el aumento de estos ácidos grasos podría estar relacionado con el funcionamiento de rutas biosintéticas que implican la transformación de membranas de ovocito a larva D y el EPA, podría estar implicado en la biotransformación a DHA, a partir de una elongación y el funcionamiento de la ruta $\Delta 4$ -desaturasa para la reorganización de membranas.

El aumento de ácidos grasos de membrana de ovocito a larva D también se produce en *E. siliqua*, por lo que en este caso, de igual forma existen procesos biosintéticos y de reestructuración de membranas. Principalmente se incrementan el DHA, el 22:5n3, el EPA, el 18:0 y el 21:5n3, y sufren descensos el α -linolénico (18:3n3), el palmítico (16:0) y el oleico (18:1n9). Al realizar un análisis exhaustivo de las variaciones de estos ácidos grasos, concretamente el aumento en este período de no alimentación (lecitotrófico) del 22:5n3 en ambas fracciones, se podría pensar en el funcionamiento de la Vía de Sprecher, como sucede en *V. pullastra* (Nóvoa, 2007).

En *S. marginatus* se produce una pérdida de lípidos polares en la embriogénesis, sucediendo lo contrario en las dos especies de *Ensis*. Este descenso se debe, sobre todo, a la pérdida de EPA en sus membranas, aunque también disminuyen otros ácidos grasos, como el 18:0. Sin embargo, se encontraron aumentos del 18:4n3, del DHA, del 16:0 y del 22:5n3. Parte del descenso de estos ácidos grasos, se puede atribuir a la pérdida de la membrana coriónica que envuelve al embrión hasta la fase inicial de la larva D veliger. Este descenso en los fosfolípidos, igualmente fue observado en el desarrollo temprano de *P. maximus* (Delaunay, 1992) y en las larvas de algunos peces (Trocher *et al.*, 1985; Fraser *et al.*, 1988), sugiriendo un papel energético de esta fracción. El EPA, igual que en *E. arcuatus*, desciende un poco en los lípidos neutros, pero lo hace de forma drástica en esta fracción lipídica, por lo que podríamos sugerir una biotransformación a DHA (que sufre un aumento) a partir de una elongación y el funcionamiento de la ruta $\Delta 4$ -desaturasa.

Al estudiar el **desarrollo larvario** (de larva D veliger a pediveliger y de pediveliger a postlarva) de las tres especies, vemos que *E. arcuatus* de larva D a larva de 8 días (veliger), presenta un comportamiento **mixotrófico**, por la disminución de

lípidos de reserva pero, sobre todo, por el descenso del EPA como ocurre con *P. maximus*. Esta estrategia asimismo se encontró en *S. marginatus*, pero más marcada y con mayor duración, hasta los 5-6 días (larvas pediveliger), presentando pérdidas de AG en las dos fracciones, de EPA y de DHA. En este caso el EPA tiene un papel eminentemente energético y no se transforma a DHA de membranas. En *S. marginatus* aún siendo mixotrófica encontramos, al igual que Martínez (2002), un acortamiento del período larvario desarrollando nuevas estructuras muy rápido, por lo que es la calidad en reservas energéticas de sus ovocitos lo que hace posible esta estrategia.

En el caso de *E. siliqua*, de larva D a larva de 8 días (pediveliger) presenta un comportamiento parecido a *V. pullastra*, donde no se observa esta fase mixotrófica al no existir pérdida de AGTs en los LN. Su desarrollo larvario es más corto que el de *E. arcuatus*, llega antes a pediveliger (7 días), por lo que tiene menos tiempo para acumular reservas a partir de la alimentación, pero tampoco consume las suyas y en consecuencia la evolución es a favor, es decir, de ganancia.

La diferencia que presentan estas tres especies con relación a su momento de metamorfosis y a su evolución en el contenido de lípidos de reserva, nos permite pensar que entre ellas también existe una diferente necesidad de la alimentación aportada. *Solen marginatus* (hasta los 5-6 días) y *E. arcuatus* (hasta los 8 días), dado su comportamiento mixotrófico, van a seguir utilizando sus reservas aunque se aumente la dosis en la dieta. Sin embargo *E. siliqua*, a los 8 días ya es pediveliger y no utiliza sus reservas, parece utilizar las aportadas por la alimentación y, aumentando la dosis podría acortarse aún más su desarrollo larvario.

De larva pediveliger a postlarva las tres especies están en la fase **plancotrófica**, con alimentación exógena a base de fitoplancton y en la que existe un acumulo de ácidos grasos en las dos fracciones lipídicas. Sin embargo, dado que dos de ellas presentan una etapa mixotrófica (transición gradual entre la utilización de las reservas vitelinas y el empleo del alimento externo) cada especie inicia esta fase en un estadio y en un día de cultivo diferente, así *E. siliqua* ya comienza en la larva D veliger (1 día), *E. arcuatus* desde larva veliger (8 días) y *S. marginatus* desde pediveliger (5-6 días).

El comportamiento de *E. arcuatus*, de larva de 8 días a pediveliger (15 días) en los lípidos de reserva, consiste en acumular mayoritariamente AGS y AGMI representados principalmente por el 16:0, el 18:0 y el 18:1n7 y por otro lado, se produce un descenso de los AGPI 18:4n3, y en menor medida del DHA. Este 22:6n3 se trasvasa a los lípidos polares para la formación de membranas en las que, por orden de importancia, se incrementan el 16:0, el 18:0, el DHA y el 18:1n9.

La transición de pediveliger a postlarva se corresponde con una etapa de metamorfosis, y por lo tanto de ayuno, empleando las reservas almacenadas en el organismo. A pesar de ello, se produce una ganancia en los lípidos de reserva y de membrana en las tres especies aunque, los ácidos grasos acumulados en éstos últimos sean algo distintos, coincidiendo en que todas aumentan sus contenidos en 16:0. En *E. arcuatus* también se incrementa el 18:0, el DHA y el EPA; en *E. siliqua* aumentan el 18:3n3 y el DHA; y *S. marginatus* acumula 18:0 y 18:3n3, pero gasta 22:4n6, DHA, 20:2n6, EPA y ARA, posiblemente para reorganizar sus membranas perdiendo fluidez.

Sin embargo, Chu & Webb (1984) encontraron en *Crassostrea virginica* que la larva con ojo (“eyed larvae”) tiene menor contenido en triglicéridos que en la larva sin ojo (“pre-eyed larvae”). Este descenso en los lípidos neutros se atribuiría a la utilización de éstos como combustible para la formación de nuevos órganos.

Es conocida la importancia de los AGPI 20:5n3 (EPA) y 22:6:3 (DHA) en los desarrollos larvarios de moluscos (Langdon & Waldock, 1981) y que, la necesidad de éstos, va a depender de las especies. Así, *Tapes semidecussatus* y *Mercenaria mercenaria* necesitan DHA, mientras que *Crassostrea* sp. muestra una necesidad fundamentalmente por el EPA (Helm & Laing, 1987). Ambos, pueden alternativamente cubrir los requerimientos de los bivalvos por los AGPI ω 3 (Langdon & Waldock, 1981) y su función puede ser como fuente de energía o como precursores para producir eicosanoides o prostaglandinas (Ackman & Kean-Howie, 1985).

Durante el desarrollo embrionario de *Patinopecten yessoensis* y *Crassadoma gigantea* se observó en los lípidos totales, un descenso lineal en el contenido de EPA, mientras que el DHA se mantuvo constante (Whyte *et al.*, 1990a, 1991). El nivel constante de 22:6n3 a lo largo de la embriogénesis, indica principalmente una función

estructural opuesta a la función energética del 20:5n3. En *P. maximus*, tanto en lípidos neutros como en polares, el EPA desciende y el DHA aumenta (Marty *et al.*, 1992). En *Mytilus galloprovincialis* el EPA desciende en lípidos neutros y polares y, el DHA, desciende en los neutros y se incrementa en los polares (Sedano, 1992) describiendo el mismo comportamiento *V. pullastra* (Nóvoa, 2007) y *S. marginatus*.

Un análisis de los resultados porcentuales en *E. arcuatus* y *E. siliqua*, puede permitir también una interpretación de que, el 22:6n3, tenga un papel estructural. El 20:5n3 tendría un papel de adquisición de energía en el desarrollo larvario, como sucede en *Ostrea edulis* (Labarta *et al.*, 1999) y en la embriogénesis y fijación de postlarvas en otros bivalvos (Delaunay *et al.*, 1993; Whyte *et al.*, 1990a, 1992).

Además, en la transición de larva a juvenil de *C. gigantea*, hay un incremento de 22:6n3 (Whyte *et al.*, 1992), un ácido graso que normalmente está asociado a estructuras de membrana (Langdon & Waldo, 1981) y esto, es lo mismo que sucede en *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*.

En los lípidos neutros de *S. marginatus*, el EPA y DHA disminuyen hasta la pediveliger y aumentan en la fijación. En los lípidos de membrana el EPA disminuye a lo largo de todo el desarrollo larvario y el DHA aumenta en la larva D, y posteriormente, desciende su cantidad por individuo hasta la fijación.

En los lípidos neutros y polares, a lo largo del desarrollo de *P. maximus*, son abundantes los AGPI ω 3, esencialmente el 20:5n3 y el 22:6n3 (Marty *et al.*, 1992), con unos contenidos más elevados que en las ostras que sustituyen estos AGPI por 22:NMID (Ackman, 1983; Labarta *et al.*, 1999). En nuestro caso, en las tres especies desciende el porcentaje de ambos ácidos grasos, en estadios finales del desarrollo larvario, incrementándose el porcentaje relativo de AGNMI.

Los ácidos grasos no-metilén-interrumpidos (AGNMI) C20 y C22 preferentemente se encuentran en los lípidos polares de *O. edulis* y de otros moluscos (Izaru *et al.*, 1984). Parece probable que éstos sean componentes estructurales de las membranas lipídicas, en vez de formar la base de eicosanoides, el rol descrito para ciertos AGPI (Ackman & Kean-Howie, 1995). Napolitano *et al.* (1988), trabajando con

larvas de *O. edulis*, indican que el origen de los AGNMI es endógeno (a partir de ácidos grasos monoenoicos), y que estos ácidos grasos, que son los precursores de los AGNMI, están presentes en cantidades importantes en las ostras. Por su parte, Labarta *et al.* (1999) indican en su estudio con *O. edulis*, que los AGNMI son elevados, especialmente el 20:2NMI, que se puede encontrar en cantidades similares a las de algunos AGPI a lo largo del desarrollo larvario, pero que empiezan a perder su relativa importancia a partir de la metamorfosis. *Crassostrea gigas* también posee porcentajes elevados de 22:2NMI (Waldock & Nascimento, 1979; Whyte, 1988). Las larvas de *M. galloprovincialis* poseen niveles relativamente altos de los isómeros 22:2, sobre todo en la fracción fosfolipídica (Sedano, 1992). Sin embargo, en especies de pectínidos los porcentajes presentes son trazas, como en *P. maximus* (Marty *et al.*, 1992), o bajos, como en *P. yessoensis* o *C. gigantea* (Whyte, 1988).

En nuestro caso, los porcentajes de AGNMI son elevados en los lípidos polares en *E. arcuatus* y *E. siliqua*, mientras *S. marginatus* presenta porcentajes elevados tanto en los lípidos de reserva como en los de membrana. Las cantidades de estos AGNMI serían similares a las de algunos AGPI. En *S. marginatus* los AGNMI en los lípidos neutros podrían servir como reservorios para los lípidos de membrana. Además, en las dos especies de *Ensis* el 22:2NMI es mucho más importante que el 20:2NMI, siendo esta diferencia menor en *S. marginatus*, que además presenta contenidos superiores a los de *Ensis*. Estudiando la evolución a lo largo del desarrollo larvario se pueden diferenciar dos estrategias opuestas, la de los lípidos polares en *E. arcuatus* que presenta los máximos porcentuales a los 8 días y en la pediveliger, y la estrategia de *E. siliqua* y *S. marginatus* en la que aumenta ligeramente la contribución de los AGNMI en la larva D, descende en la pediveliger y alcanza máximos en la postlarva recién fijada.

Por las distintas evoluciones que presentan estas especies a lo largo del desarrollo larvario se podría pensar que las larvas presentan cierta capacidad biosintética de estos ácidos grasos. Los AGMNI se sintetizan “*de novo*” en los bivalvos, como fue propuesto en primer lugar por Ackman & Hooper (1973) y demostrado por Zhukova (1986, 1991). La ruta consiste en una $\Delta 9$ desaturación y elongación del 16:0 y 18:0, respectivamente, en 20:1n7 y 20:1n9. Una $C_{20}\Delta 5$ desaturación los convierte, respectivamente, en 5,13-20:2 y 5,11-20:2, los cuales finalmente se elongan dando lugar a 7,15-22:2 y 7,13-22:2.

18:1n9 → 20:1n9 → 5,11-20:2 → 7,13-22:2

18:1n7 → 20:1n7 → 5,13-20:2 → 7,15-22:2

Por lo anteriormente expuesto, se puede ver como la estrategia de las tres especies es diferente. Así, en *E. arcuatus* no descienden las reservas de lípidos neutros en la embriogénesis y en las otras dos especies sí. Se puede apreciar tanto en *E. arcuatus* como en *S. marginatus*, la presencia de un período mixotrófico. La especie *S. marginatus* presenta un desarrollo larvario bastante diferente a las dos especies de *Ensis*, partiendo de un ovocito con muchas reservas que le permiten un desarrollo muy rápido, alcanzando la metamorfosis con un contenido en reservas y lípidos de membrana menor, pero próximo, al contenido inicial de los ovocitos.

VII. Conclusiones

VII. CONCLUSIONES

- 1.- En las tres especies se consigue ampliar el período de madurez dos meses, mediante la modificación de la temperatura y/o la alimentación. En *Ensis arcuatus* se obtienen mejores resultados realizando el acondicionamiento a bajas temperaturas.
- 2.- Empleando el método del choque térmico se consigue inducir a la puesta a *Ensis siliqua* y *Solen marginatus*, mientras que en *E. arcuatus* los mejores resultados se obtienen con cambios del nivel del agua.
- 3.- Las tres especies tienen una duración del desarrollo larvario distinta, siendo *S. marginatus* la que presenta un desarrollo larvario más corto (8 días) y una supervivencia más alta. Le sigue *E. siliqua* en duración del desarrollo y supervivencia larvaria y por último, se encuentra *E. arcuatus*.
- 4.- La fase más crítica del cultivo de estas especies es el cultivo de postlarvas, donde la mortalidad es elevada hasta alcanzar la talla de 1 mm. El empleo de sustrato en los sistemas de cultivo de postlarvas y semilla va a depender de la talla inicial y de la especie.
- 5.- Los datos de crecimiento de semilla en el medio natural de *S. marginatus* indican que se puede alcanzar la talla comercial (80 mm) a partir de los tres años de vida. Se cerró el ciclo de cultivo de esta especie, consiguiendo semilla a partir de estos ejemplares.
- 6.- El desarrollo embrionario de *E. siliqua* es más rápido que el de *E. arcuatus*, observándose el estadio de trocófora y de larva D veliger a las 12 y 24 horas post-fertilización en la primera especie, respectivamente. El estudio con microscopía electrónica de barrido permite observar la aparición de la glándula de la concha entre los estadios de gástrula tardía y trocófora en ambas especies.
- 7.- En los ovocitos de las tres especies se almacenan preferentemente proteínas y lípidos, destacando los elevados contenidos de *S. marginatus*.

8.- La estrategia de estas especies consiste en utilizar las proteínas en el desarrollo embrionario y posteriormente a lo largo del desarrollo larvario, desde larva D hasta la fijación, acumulando indistintamente reservas energéticas procedentes de la alimentación para superar la metamorfosis.

9.- La diferente duración del desarrollo larvario entre *E. arcuatus* y *E. siliqua* no estaría explicada por la composición bioquímica y de ácidos grasos de los ovocitos, puesto que ésta es similar. En cambio, *S. marginatus* presenta un desarrollo larvario bastante diferente a las dos especies de *Ensis*, partiendo de un ovocito con muchas reservas en forma de ácidos grasos que le permiten un desarrollo muy rápido, alcanzando la metamorfosis con un contenido en lípidos de reserva y membrana menor al contenido inicial de los ovocitos.

10.- Durante la embriogénesis en *E. arcuatus* no descienden las reservas de lípidos neutros (función energética) mientras que, en *E. siliqua* y *S. marginatus*, el desarrollo embrionario sobre todo se hace a expensas de la energía almacenada en forma de lípidos neutros.

11.- En *E. arcuatus* y *S. marginatus* hay un período mixotrófico en el desarrollo larvario, durando en *E. arcuatus* hasta la larva umbonada de 8 días y en *S. marginatus* hasta el estadio de pediveliger.

12.- Las cantidades elevadas de ácidos grasos no-metilén-interrumpidos presentes en los lípidos polares en *E. arcuatus* y *E. siliqua* y tanto en los lípidos de reserva como los de membrana de *S. marginatus*, son una característica definitoria de estas especies.

VIII. Bibliografía

VIII. BIBLIOGRAFÍA

Abad, M.; Louro, A.; de la Roche, J.P.; García-Martínez, P.; Pazos, A. & Román, G. 2005. Efecto del fotoperíodo sobre el acondicionamiento de la zamburiña, *Chlamys varia*. Desarrollo gonadal. *Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura*. Gandía, Valencia. 588-589.

Abad, M.; Ruiz, C.; Martínez, D.; Mosquera, G. & Sánchez, J.L. 1995. Seasonal variations of lipid classes and fatty acids in flat oyster, *Ostrea edulis*, from San Cibrao (Galicia, Spain). *Comp. Biochem. Physiol.* 110C: 109-118.

Ackman, R.G. 1983. Fatty acid metabolism of marine bivalves. pp: 358-376. En: Pruder, G.D. & Langdon, C. (ed). *Biochemical and physiological approaches to shellfish nutrition*. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA.

Ackman, R.G. & Hooper, S.N. 1973. Non-methylene-interrupted fatty acids in lipids of shallow-water marine invertebrates: a comparison of two mollusks (*Littorina littorea* and *Lunatia triseriata*) with Sand Shrimp (*Crangon septemspinosus*). *Comp. Biochem. Phys.* 46B: 153-165.

Ackman, R.G. & Kean-Howie, J. 1995. Fatty acids in aquaculture: are n-3 fatty acids always important? pp: 82-104. En: Lim, C. & Sessa, D.J. (ed). *Nutrition and utilization technology in aquaculture*. AOCS Press, Champaign, Illinois, USA

Ackman, R.G.; Tocher, C.S. & McLachlan, J. 1968. Marine phytoplankton fatty acids. *J. Fish. Res. Board Canada*. 25: 1603-1620.

Alatalo, P.; Berg, C.J. & D'Asaro, C.N. 1984. Reproduction and development of the lucinid clam *Codakia orbicularis* (Linné, 1758). *Bull. Mar. Sci.* 34: 424-434.

Albers, C.S.; Kattner, G. & Hagen, W. 1996. The compositions of wax esters, triacylglycerols and phospholipids in Arctic and Antarctic copepods: evidence of energetic adaptations. *Mar. Chem.* 55: 347-358.

Allen, R.D. 1953. Fertilization and artificial activation in the egg of the surf-clam, *Spisula solidissima*. *Biol. Bull.* 105: 213-239.

Amemiya, I. 1926. Notes on experiments on the early developmental stages of the Portuguese, American and English native oysters, with special reference to the effect of varying salinity. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 14: 161-175.

André, C.; Lindergarth, M.; Jonsson, P.R. & Sundberg, P. 1999. Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarcki*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 79: 563-565.

Ansell, A.D. 1961. Reproduction, growth and mortality of *Venus striatula* (Da Costa) in Kames Bay, Millport. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 41: 419-443.

- Araujo, R. & Ramos, M.A. 1998. Description of the glochidium of *Margaritifera auricularia* (Spengler, 1793) (Bivalvia, Unionoidea). *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 353: 1553-1559.
- Barlett, B.R. 1979. Biochemical changes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg) during larval development and metamorphosis. *Proc. Natl. Shellfish Assoc.* 69: 202.
- Barón, P.J.; Real, L.E.; Ciocco, N.F. & Ré, M.E. 2004. Morphometry, growth and reproduction of an Atlantic population of the razor clam *Ensis macha* (Molina, 1782). *Sci. Mar.* 68: 211-217.
- Bayne, B.L. 1965. Growth and delay of metamorphosis of the larvae of *Mytilus edulis* (L). *Ophelia*. 2: 1-47.
- Bayne, B.L. 1972. Some effects of stress in the adult on the larval development of *Mytilus edulis*. *Nature*. 237: 459.
- Bayne, B.L. 1973. Aspects of the metabolism of *Mytilus edulis* during starvation. *Neth. J. Sea Res.* 7: 399-441.
- Bayne, B.L. 1983. The physiological ecology of marine molluscan larvae. pp: 299-343. En: Verdonk, N.H.; Van den Biggelaar, J.A.M. & Tompa, A.S. (ed). *The Mollusca, Vol. 3, Development*. Academic Press, Nueva York, USA.
- Bayne, B.L.; Bubel, A.; Gabbott, P.A.; Livingstone, D.R. & Moore, M.N. 1982. Glycogen utilization and gametogenesis in *Mytilus edulis* L. *Mar. Biol. Lett.* 3: 89-105.
- Bayne, B.L.; Gabbott, P.A. & Widdows, J. 1975. Some effects of stress in the adult on the egg and larvae of *Mytilus edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 55: 675-689.
- Bayne, B.L. & Newell, R.C. 1983. Physiological energetic of marine molluscs. pp: 407-415. En: Saleudin, A.S.M. & Wilbur, K.M. (ed). *The Mollusca: Vol. 4, Physiology*. Academic Press, Nueva York, USA.
- Belding, D.L. 1910. A report upon the scallop fishery of Massachusetts, including the habits, life history of *Pecten irradians*, its rate of growth and other factors of economic value. *Special Rep., Comm. Fish. and Game, Massachusetts*. 1-150.
- Bellolio, G.; Lohrmann, K. & Dupré, E. 1993. Larval morphology of the scallop *Argopecten purpuratus* as revealed by scanning electron microscopy. *The Veliger*. 36: 332-342.
- Bellolio, G.; Toledo, P. & Dupré, E. 1996. Desarrollo larvario de *Choromytilus chorus* en condiciones de laboratorio. *Sci. Mar.* 60: 353-360.
- Ben-Amotz, A.; Fishler, R. & Shneller, A. 1987. Chemical composition of dietary species of marine unicellular algae and rotifer with emphasis on fatty acids. *Mar. Biol.* 95: 31-36.

- Benninger, P.G.; Dwiono, S.A.P. & Le Pennec, M. 1994. Early development of the gill and its implications for feeding in *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). *Mar. Biol.* 119: 405-412.
- Bensadoun, A. & Weinstein, D. 1976. Assay of proteins in the presence of interfering material. *Analyt. Biochem.* 70: 241-250.
- Beukema, J.J. & De Bruin, W. 1979. Caloric values of the soft parts of the tellinid larvae *Macoma balthica* (L.) as determined by two methods. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 37: 19-30.
- Beukema, J.J. & Dekker, R. 1995. Dynamics and growth of a recent invader into european coastal waters: the american razor clam, *Ensis directus*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 75: 351-362.
- B.I.M. (Bord Iascaigh Mhara). 2005. *European market for razor clams (Ensis ensis and Ensis siliqua)*. Irish Sea Fisheries Board. B.I.M Market Development Division. Ireland. 31 pp.
- Bloomer, H.H. 1901. The anatomy of the British species of the Genus *Solen* Linné Pt. I. *J. Malac.* 8: 36-46.
- Bloomer, H.H. 1903. On the origin and function of the fourth aperture in some Pelecypoda. *J. Malac.* 10: 43-45.
- Breese, W.P. & Robinson, A. 1981. Razor clams, *Siliqua patula* (Dixon): Gonadal development, induced spawning and larval rearing. *Aquaculture*. 22: 27-33.
- Bricelj, V.M. 1979. Fecundity and related aspects of hard clam (*Mercenaria mercenaria*) reproduction in Great South Bay, New York. *M.S. Thesis, State University of New York at Stony Brook*. Nueva York, USA. 95 pp.
- Brown, M.R.; Jeffrey, S.W. & Garland, C.D. 1989. Nutritional aspects of microalgae used in mariculture: a literature review. *CSIRO Mar. Rep.* 205 pp.
- Brown, M.R.; Jeffrey, S.W.; Volkman, J.K. & Dunstan, G.A. 1997. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. 151: 315-331.
- Brown, M.R. 1991. The amino acid and sugar composition of 16 species of microalgae used in mariculture. *Aquaculture*. 145: 79-99.
- Byrne, M.; Phelps, H.; Church, T.; Adair, V.; Selvakumaraswamy, P. & Potts, J. 2000. Reproduction and development of the freshwater clam *Corbicula australis* in southeast Australia. *Hydrobiologia*. 418: 185-197.
- Caers, M.; Coutteau, P. & Sorgeloos, P. 1999. Dietary impact of algal and artificial diets, fed at different rations, on the growth and fatty acid composition of *Tapes philippinarum* (L.) spat. *Aquaculture*. 170: 307-322.

- Carriker, M.R. 1967. Ecology of estuarine benthic invertebrates: a perspective. *Publs. Am. Ass. Advmt. Sci.* 83: 442-487.
- Carriker, M.R. & Palmer, R.E. 1979. Ultrastructural morphogenesis of prodissoconch and early dissoconch valves of the oyster *Crassostrea virginica*. *Proc. Natl. Shellfish. Assoc.* 69: 103-128.
- Casavola, N.; Rizzi, E.; Marano, G. & Saracino, C. 1985. Ciclo riproduttivo e biometria di *Ensis minor* (Chenu) (Bivalvia: Solenidae) nel Golfo di Manfredonia. *Oebalia*. 11: 439-449.
- Casse, N.; Devauchelle, N. & Le Pennec, M. 1998. Embryonic shell formation in the Scallop *Pecten maximus* (Linnaeus). *The Veliger*. 41: 133-141.
- Catoira, J.L. & Traba, J.M. 1997. La explotación del longueirón de fondo, *Ensis siliqua* (Linnaeus, 1758), en Fisterra: métodos de captura y análisis económico. *Xornadas técnicas sobre o desenvolvemento do marisqueo a pé*.
- Chanley, P. & Andrews, J.D. 1971. Aids for identification of bivalve larvae of Virginia. *Malacologia*. 111: 45-119.
- Chaparro, O.R.; Thompson, R.J. & Emerson, C.J. 1999. The velar ciliature in the brooded larva of the chilean oyster *Ostrea chilensis* (Philippi, 1845). *Biol. Bull.* 197: 104-111.
- Chaparro, O.R.; Videla, J.A. & Thompson, R.J. 2001. Gill morphogenesis in the oyster *Ostrea chilensis*. *Mar. Biol.* 138: 199-207.
- Chávez-Villalba, J.; Barret, J.; Mingant, C.; Cochard, J.C. & Le Pennec, M. 2002a. Autumn conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: a new approach. *Aquaculture*. 210: 171-186.
- Chávez-Villalba, J.; Pommier, J.; Andriamiseza, J.; Pouvreau, S.; Barret, J.; Cochard, J. C. & Le Pennec, M. 2002b. Broodstock conditioning of the oyster *Crassostrea gigas*: origin and temperature effect. *Aquaculture*. 214: 115-130.
- Christie, W.W. 1982. The structure, chemistry and occurrence of lipids. pp: 1-16. En: Maxwell, R. (ed). *Lipid analysis*. Pergamon Press, Oxford, Reino Unido.
- Chu, F.L.E. & Webb, K.L. 1984. Polyunsaturated fatty acids and neutral lipids in developing larvae of the oyster, *Crassostrea virginica*. *Lipids*. 19: 815-820.
- Coffroth, M.A. & Mulawka III, J.M. 1995. Identification of marine invertebrate larvae by means of PCR-RAPD species-specific markers. *Limnol. Oceanogr.* 40: 181-189.
- Collyer, D.M. 1957. Viability and glycogen reserves in the newly liberated larvae of *Ostrea edulis*. *J. Mar. Biol. Assoc. U.K.* 36: 333-335.
- Costa, C.; Bianchini, M.; Caccarelli, P.; Rambaldi, E. & Volterra, L. 1987. Indagine sui molluschi bivalvi di interesse commerciale (Telline, Cannolicchi e Volgole) delle coste

della Toscana, del Lazio e della Campania. 1985-1987. *Quaderni Ist. Idrobiol. Acquacolt. Brunelli*. 7: 3-58.

Costello, D.P. & Henley, C. 1971. Methods for obtaining and handling marine eggs and embryos. *Woods Hole, MA: Mar. Biol. Lab.* 247 pp.

Coutteau, P.; Castell, J.D.; Ackman, R. & Sorgeloos, P. 1996. The use of lipid emulsions as carriers for essential fatty acids in bivalves: A test case with juvenile *Placopecten magellanicus*. *J. Shellfish Res.* 15: 259-264.

Cowey, C.B.; Owen, J.M.; Adron, J.W. & Middleton, C. 1976. Studies on the nutrition of marine fish. The effect of different dietary fatty acids on the growth and fatty acid composition of turbot (*Scophthalmus maximus*). *Br. J. Nutr.* 36: 479-486.

Cragg, S.M. 1985. The adductor and retractor muscles of veliger of *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). *J. Moll. Stud.* 51: 276-283.

Cragg, S.M. 1989. The ciliated rim of the velum of larvae of *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). *J. Moll. Stud.* 55: 492-508.

Cromie, A.; Werner, A. & McDonough, N. 2006. Developing optimal diets for razor clam postlarvae. *C-Mar Annual Workshop*. Portaferry, Irlanda del Norte, Reino Unido, 14-15 de septiembre.

da Costa, F.; Martínez-Patiño, D.; Álvarez, F.; Nóvoa, S. & Ojea, J. 2008. Talla de primera maduración del longueirón vello *Solen marginatus* (Pennánt, 1777). *XI Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas*.

da Costa, F.; Nóvoa, S. & Martínez, D. 2006. Effects of temperature upon larval culture in the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865). *AQUA2006. Linking Tradition & Technology*. Florencia, Italia. 211.

da Costa, F.; Nóvoa, S.; Ojea, J. & Martínez, D. 2005. Acondicionamiento del solénido *Ensis arcuatus* en 2 regímenes de temperatura: relación con las proteínas y el glucógeno. *Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura*. Gandía, Valencia. 608-609.

Darriba, S. 2001. Biología de la navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865) de la Ría de Vigo (N.O. de España): Crecimiento y reproducción. *Tesis doctoral. Univ. de Vigo*. 283 pp.

Darriba S.; Martínez, D. & Guerra, A. 2002. The razor clam *Ensis arcuatus*: perspectives for hatchery outgrowing culture. *Abstracts Aquaculture Europe 2002. Special publication n° 32*. 198-199.

Darriba, S.; San Juan, F. & Guerra, A. 2004. Reproductive cycle of the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in northwest Spain and its relation to environmental conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 311: 101-115.

- Darriba, S.; San Juan, F. & Guerra, A. 2005. Energy storage and utilization in relation to the reproductive cycle in the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865). *ICES J. Mar. Sci.* 62: 996-996.
- D'Asaro, C.N. 1967. The morphology of the larval and postlarval *Chione cancellata* Linné (Eulamellibranchia: Veneridae) reared in the laboratory. *Bull. Mar. Sci.* 17: 949-972.
- Davis, H.C. 1953. On the food and feeding of the larvae of the american oyster *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull., Woods Hole*. 104: 334-350.
- Davis, H.C. & Guillard, R.R. 1958. Relative value of ten genera of microorganisms as food for oyster and clam larvae. *Fish. Bull. U.S.* 58: 293-304.
- Deiner, M. & Tamm, S.L. 1991. Mechanism of paddle cilia formation in molluscan veligers. *Biol. Bull. Mar. Biol. Lab., Woods Hole*. 181: 335-336.
- Deiner, M.; Tamm, S.L. & Tamm, S. 1993. Mechanical properties of ciliary axonemes and membranes as shown by paddle cilia. *J. Cell Sci.* 104: 1251-1262.
- De la Roche, J.P.; Marín, B.; Freitas, L. & Vélez, A. 2002. Embryonic development and larval and post-larval growth of the tropical scallop *Nodipecten* (= *Lyropecten*) *nodosus* (L. 1758) (Mollusca: Pectinidae). *Aquaculture Res.* 33: 819-827.
- Delaunay, F. 1992. Nutrition lipidique de la coquille Saint-Jacques *Pecten maximus* (L.) au cours du développement larvaire. *Thèse de doctoral. Univ. de Brest*. 192 pp.
- Delaunay, F.; Marty, Y. & Moal, J. 1989. Evaluation des classes de lipides au cours du développement larvaire de *Pecten maximus*. *Océanis*. 15: 519-530.
- Delaunay, F.; Marty, Y.; Moal, J. & Samain, J.F. 1993. The effect of monospecific algal diets on growth and fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) larvae. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 173: 163-179.
- Delgado, M. & Pérez-Camacho, A. 2007. Comparative study of gonadal development of *Ruditapes philippinarum* (Adams and Reeve) and *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: Bivalvia): influence of temperature. *Sci. Mar.* 71: 471-484.
- Demers, A.; Lagadeuc, Y.; Dodson, J.J. & Lemieux, R. 1993. Immunofluorescence identification of early life history stages of scallops (Pectinidae). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 97: 83-89.
- De Moreno, J.E.; Moreno, V.J. & Brenner, R.R. 1976. Lipid metabolism of the yellow clam, *Mesodesma mactroides*: 2-polyunsaturated fatty acid metabolism. *Lipids*. 11: 561-566.
- De Pauw, N. & Persoone, G. 1988. Microalgae for aquaculture. pp: 197-221. En: Borowitzka, M.A. & Borowitzka, L.J. (ed). *Microalgal Biotechnology*. Cambridge University Press, Cambridge, Reino Unido.

- Devauchelle, N. & Mingant, C. 1991. Review of the reproductive physiology of the scallop, *Pecten maximus*, applicable to intensive aquaculture. *Aquat. Living Resour.* 4: 41-51.
- Dey, N.D. 1979. Growth of sibling hard clams, *Mercenaria mercenaria* (L.) in a controlled environment. *M.S. Thesis, College Marine Studies, University of Delaware.* 66 pp.
- Dinamani, P. 1973. Embryonic and larval development in the New Zealand rock oyster, *Crassostrea glomerata* Gould. *The Veliger.* 154: 295-299.
- Dorange, G. & Le Pennec, M. 1989. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. *Mar. Biol.* 103: 339-348.
- Doroudi, M.S. & Southgate, P.C. 2000. The influence of algal ration and larval density on growth and survival of blacklip pearl oyster *Pinctada margaritifera* (L.) larvae. *Aquaculture Res.* 31: 621-626.
- Drew, G.A. 1907. The habits and movements of the razor shell clam, *Ensis directus*, Conrad. *Biol. Bull.* 12: 127-140.
- Dupuy, J.L.; Windsor, N.T. & Sutton, C.E. 1977. Manual for design and operation of an oyster seed hatchery. *Special Report. Applied Sci. Ocean Eng., VA Inst. Mar. Sci., VIMS.* Gloucester Point, VA. USA. 120 pp.
- Elston, R.A. 1980. Functional anatomy, histology and ultrastructure of the soft tissues of the larval american oyster *Crassostrea virginica*. *Proc. Nat. Shellfish. Ass.* 70: 65-93.
- Elston, R.A. 1984. Prevention and management of infectious diseases in intensive mollusk husbandry. *J. World Maricult. Soc.* 15: 284-300.
- Elston, R.A. 1999. Anatomy of metamorphosis. pp: 19-22. En: Browdy, C.L. *Health management, development and histology of seed oysters.* World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Elston, R.A.; Leibovitz, L.; Relyea, D. & Zatlila, J. 1981. Diagnosis of vibriosis in a commercial oyster hatchery epizootic: diagnostic tools and management features. *Aquaculture.* 24: 53-62.
- Enright, C.T.; Newkirk, G.F.; Craigie, J.S. & Castell, J.D. 1986a. Evaluation of phytoplankton as diet for juvenile *Ostrea edulis* L. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 96: 1-13.
- Enright, C.T.; Newkirk, G.F.; Craigie, J.S. & Castell, J.D. 1986b. Growth of juvenile *Ostrea edulis* L. fed *Chaetoceros gracilis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 96: 15-26.
- Epifanio, C.E. 1976. Culture of bivalve molluscs in recirculating systems: Nutrition. pp: 173-194. En: Price, K.S.; Shaw, W. & Dunberg, K. (ed). *Proceedings 1st International Conference on Aquaculture Nutrition.* Newark, Delaware, USA.

- Epifanio, C.E.; Valenti, C.C. & Tuck, C.L. 1981. A comparison of *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana* as food for the oyster, *Crassostrea virginica*. *Aquaculture*. 23: 437-353.
- Evseev, G.A.; Kolotukhina, N.K. & Semenikhina, O.Y. 2001. Shell morphogenesis of several venerid bivalves. *J. Shellfish Res.* 20: 1279-1284.
- Eyster, L.S. & Morse, M.P. 1984. Early shell formation during molluscan embryogenesis with new studies on the surf clam *Spisula solidissima*. *Am. Zool.* 24: 871-882.
- Fabioux, C.; Huvet, A.; Le Souchu, P.; Le Pennec, M. & Pouvreau, S. 2005. Temperature and photoperiod drive *Crassostrea gigas* reproductive internal clock. *Aquaculture*. 250: 458-470.
- FAO. 2005. FAO Yearbook of Fishery Statistics: Captures. 2003. Vol 96/1.
- Fariás, A.; Uriarte, I. & Castilla, J.C. 1998. A biochemical study of the larval and postlarval stages of the chilean scallop *Argopecten purpuratus*. *Aquaculture*. 166: 37-47.
- Fernández-Reiriz, M.J.; Pérez-Camacho, A.; Ferreiro, M.J.; Blanco, J.; Planas, M.; Campos, M.J. & Labarta, U. 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (Total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture*. 83: 17-37.
- Fernández-Reiriz, M.J.; Labarta, U.; Albentosa, M. & Pérez-Camacho, A. 2006. Lipid composition of *Ruditapes philippinarum* spat: Effect of ration and diet quality. *Comp. Biochem. Phys. B.* 144: 229-237.
- Ferreiro, M.J.; Pérez-Camacho, A.; Labarta, U.; Beiras, R.; Planas, M. & Fernández-Reiriz, M.J. 1990. Changes in the biochemical composition of *Ostrea edulis* fed on different food regimes. *Mar. Biol.* 106: 395-401.
- Field, I.A. 1922. Biology and economic value of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Bull. U.S. Bur. Fish.* 38: 127-259.
- Fraga, F. 1956. Determinación de glucógeno en moluscos con el reactivo de la antrona. *Inv. Pesq.* III: 69-74.
- Fraser, A.; Gamble, J.C. & Sargent, J.R. 1988. Changes in lipid content, lipid class composition and fatty acid composition of developing eggs and unfed larvae of cod (*Gadus morhua*). *Mar. Biol.* 99: 307-314.
- Freites, L.; Fernández-Reiriz, M.J. & Labarta, U. 2002. Fatty acid profiles of *Mytilus galloprovincialis* (Lmk) mussel of subtidal and rock shore origin. *Comp. Biochem. Physiol.* 132B: 453-461.
- Frenkiel, L. & Mouëza, M. 1979. Développement larvaire de deux Tellinaceae, *Scrobicularia plana* (Semelidae) et *Donax vittatus* (Donacidae). *Mar. Biol.* 55: 187-195.

- Freudentahl, A.S. & Nielsen, M.M. 2005. Initial investigations on seed production of the American Razor Clam. *Workshop Internacional. Estado Actual de la Biología y Cultivo de Bivalvos Enterradores*. Concepción, Chile, 19-20 de abril.
- Frogia, C. 1975. Osserzazioni sull'accrescimento di *Chamelea gallina* (L.) ed *Ensis minor* (Chenu) nel medio Adriatico. *Quad. Lab. Tecnol. Pesca*. 2: 37-48.
- Fuller, C.S. & Lutz, R.A. 1989. Shell morphology of larval and post-larval mytilids from the north-western Atlantic. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 69: 181-218.
- Gabbott, P.A. 1983. Developmental and seasonal metabolic activities in marine molluscs. pp: 165-217. En: Hochachka, P.W. (ed). *The Mollusca. Vol 2, Environmental biochemistry and physiology*. Academic Press, Nueva York, USA.
- Gabbott, P.A. & Holland, D.L. 1973. Growth and metabolism of *Ostrea edulis* larvae. *Nature*. 241: 475.
- Gallager, S.M. & Mann, R. 1986. Growth and survival of larvae of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Crassostrea virginica* (Gmelin) relative to broodstock conditioning and lipid content of eggs. *Aquaculture*. 56: 105-121.
- Gallager, S.M.; Mann, R. & Sasaki, G.C. 1986. Lipid as an index of growth and viability in three species of bivalves. *Aquaculture*. 56: 81-103.
- Galtsoff, P.S. 1930. The fecundity of the oyster. *Science*. 72: 97-98.
- Galtsoff, P.S. 1937. Spawning and fertilization of the oyster, *Ostrea virginica*. pp: 537-539. En: Galtsoff, P.S.; Lutz, F.E.; Welch, P.S. & Needham, J.G. (ed). *Culture Methods for Invertebrate Animals*. Comstock Publishing Company. Ithaca, Nueva York, USA.
- Gaspar, M.B. 1996. Bivalves do Litoral Oceânico Algarvio. Aspectos da biologia, ecologia e da pescaria dos mananciais de interesse económico: aplicação à gestão dos recursos. *Tesis doctoral. Univ. do Algarve*, Faro. 282 pp.
- Gaspar, M.B.; Richardson, C.A. & Monteiro, C.C. 1994. The effects of dredging on shell formation in the razor clam *Ensis siliqua* from Barrinha, Southern Portugal. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 74: 927-938.
- Goodsell, J.G.; Fuller, S.C.; Eversole, A.G.; Castagne, M. & Lutz, R.A. 1992. Larval and early postlarval shell morphology of several venerid clams. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 72: 231-255.
- Graham, A. 1931. On the morphology, feeding mechanism and digestion of *Ensis siliqua* (Schumacher). *Trans. R. Soc. Edin.* 56: 725-751.
- Gribben, P.E. & Hay, B.E. 2003. Larval development of the New Zealand geoduck *Panopea zelandica* (Bivalvia: Hiatellidae). *New Zealand J. Mar. Freshw. Res.* 37: 231-239.

Griffond, B.; Gomot, P. & Gomot, L. 1992. Influence de la température sur le déroulement de l'ovogénèse chez l'escargot *Helix aspersa*. *J. Therm. Biol.* 17: 185-190.

Gros, O.; Frenkiel, L. & Mouëza, M. 1997. Embryonic, larval and post-larval development in the symbiotic clam, *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebr. Biol.* 116: 86-101.

Gros, O.; Duplessis, M.R. & Felbeck, H. 1999. Embryonic development and endosymbiont transmission mode in the symbiotic clam *Lucinoma aequizonata* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebr. Reprod. Dev.* 36: 93-103.

Gruffydd, L.D. 1976. The development of the larva of *Chlamys islandica* in the plankton and its salinity tolerance in the laboratory (Lamellibranchia: Pectinidae). *Astarte*. 8: 61-67.

Guerra, A. 1979. Producción de semilla de ostra y almeja en la Planta de Cultivos Marinos de Ribadeo. *Cuad. Marisq.* 14 pp.

Gustafson, R.G. & Lutz, R.A. 1992. Larval and early post-larval development of the protobranch bivalve *Solemya velum* (Mollusca: Bivalvia). *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 72: 383-402.

Gustafson, R.G. & Reid, R.G.B. 1986. Development of the pericalymma larva of *Solemya reidi* (Bivalvia: Cryptodonta: Solemyidae) as revealed by light and electron microscopy. *Mar. Biol.* 93: 411-427.

Hamida, L.; Medhiouband, M.N.; Cochard, J.C.; Romdhane, M.S. & Le Pennec, M. 2004. Étude comparative du cycle de reproduction de la palourde *Ruditapes decussatus* en milieu naturel (sud Tunisie) et contrôlé (écloserie). *Cah. Biol. Mar.* 45: 291-303.

Hanyu, K.; Toyama, K.; Kimura, T. & Sekiguchi, H. 2001. Larval and post-larval shell morphology of the green mussel *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Mytilidae). *Amer. Malac. Bull.* 16: 171-177.

Hare, M.P.; Palumbi, S.R. & Butman, C.A. 2000. Single-step species identification of bivalve larvae using multiplex polymerase chain reaction. *Mar. Biol.* 137: 953-961.

Haws, M.C.; DiMichele, L. & Hand, S.C. 1993. Biochemical changes and mortality during metamorphosis of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 2: 207-217.

Helm, M.M. 1977. Mixed algal feeding of *Ostrea edulis* larvae with *Isochrysis galbana* and *Tetraselmis suecica*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 57: 1019-1029.

Helm, M.M.; Holland, D.L. & Stephenson, R.R. 1973. The effect of supplementary algal feeding of a hatchery and breeding stock of *Ostrea edulis* L. on larval vigour. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 53: 673-684.

Helm, M.M. & Laing, I. 1987. Preliminary observations on the nutritional value of "Tahiti *Isochrysis*" to bivalve larvae. *Aquaculture*. 62: 281-288.

- Henderson, S.M. & Richardson, C.A. 1994. A comparison of the age, growth rate and burrowing behaviour of the razor clams, *Ensis siliqua* and *Ensis ensis*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 74: 939-954.
- Hess, H.H.; Lees, J.E. & Derr, J.E. 1978. A linear Lowry-Folin assay for both water-soluble and sodium dodecyl sulfate-solubilized proteins. *Analyt. Biochem.* 85: 259-300.
- His, E. & Maurer, D. 1988. Shell growth and gross biochemical composition of oyster larvae (*Crassostrea gigas*) in the field. *Aquaculture*. 69: 185-194.
- Hodgson, C.A. & Burke, R.D. 1988. Development and larval morphology of the spiny scallop, *Chlamys hastata*. *Biol. Bull.* 174: 303-318.
- Holland, D.L. 1978. Lipid reserves and energy metabolism in the larvae of benthic marine invertebrates. pp: 85-123. En: Malins, D.C. & Sargent, J.R. (eds). *Biochemical and biophysical perspectives in marine biology, Vol 4*. Academic Press, Londres, Reino Unido.
- Holland, D.L. & Hannant, P.J. 1974. Biochemical changes during growth of the spat of the oyster, *Ostrea edulis* L. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 54: 1007-1016.
- Holland, D.L. & Spencer, B.E. 1973. Biochemical changes in fed and starved oysters, *Ostrea edulis* (L.) during larval development, metamorphosis and early spat growth. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 53: 287-298.
- Honkoop, P.J.; Van der Meer, J.; Beukema, J.J. & Kwast, D. 1999. Reproductive investment in the intertidal bivalve *Macoma balthica*. *J. Sea Res.* 41: 203-212.
- Hooker, S.H. 1997. Larval and postlarval development of the New Zealand pipi, *Phaphys australis* (Bivalvia: Mesodesmatidae). *Bull. Mar. Sci.* 61: 225-240.
- Hu, Y-P.; Lutz, R.A. & Vrijenhoek, R.C. 1992. Electrophoretic identification and genetic analysis of bivalve larvae. *Mar. Biol.* 113: 227-230.
- Hu, Y-P.; Fuller, C.; Castagna, M.; Vrijenhoek, R.C. & Lutz, R. 1993. Shell morphology and identification of early life history stages of congeneric species of *Crassostrea* and *Ostrea*. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 73: 471-496.
- Iwata, K.S. 1951a. Spawning of *Mytilus edulis*. IV. Discharge by KCl injection. *Nippon Suis. Gak.* 16: 393-394.
- Iwata, K.S. 1951b. Spawning of *Mytilus edulis*. VIII. Comparison of abilities of salts of alkali metals and of alkali earth metals to induce spawning. *Nippon Suis. Gak.* 17: 94-95.
- Izaru, C.E.; Pollero, R.J. & Brenner, R.R. 1984. Occurrence of a 22:2 non-methylene-interrupted dienoic fatty acid and its seasonal distribution among lipids and tissues of the fresh water bivalve *Diplodon delodontus* from an isolated environment. *Lipids*. 19: 649-655.

James, C.M.; Al-Hinty, S. & Salman, A.E. 1989. Growth and $\Delta 3$ fatty acid and amino acid composition of microalgae under different temperature regimes. *Aquaculture*. 77: 337-351.

Joseph, J.D. 1982. Lipid composition of marine and estuarine invertebrates: Mollusca. *Prog. Lipid Res.* 21: 109-153.

Kanazawa, A.; Teshima, S-I. & Ono, K. 1979. Relationship between essential fatty acid requirements of aquatic animals and the capacity for bioconversion of linoleic acid to highly unsaturated fatty acids. *Comp. Biochem. Physiol. Part B.* 63: 295-298.

Kenchington, E.; Duggan, R. & Riddell, T. 1998. Early life history characteristics of the razor clam (*Ensis directus*) and the moonsnails (*Euspira* spp.) with applications to fisheries and aquaculture. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2223: vii + 32 pp.

Kinoshita, T. 1943. Induction of the spawning of the scallop, *Pecten yessoensis* Say. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 11: 168-170.

Klingensmith, J.S. 1982. Distribution of methylene and non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in polar lipids and triacylglycerols of selected tissues of the hardshell clam *Mercenaria mercenaria*. *Lipids*. 17: 976-981.

Kniprath, E. 1980. Larval development of the shell and shell gland in *Mytilus* (Bivalvia). *Wilhelm Roux's Arch. Dev. Biol.* 188: 201-204.

Kraeuter, J.N.; Castagna, M. & Van Dessel, R. 1982. Egg size and larval survival of *Mercenaria mercenaria* (L.) and *Argopecten irradians* (Lamarck). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 56: 3-8.

Kreeger, D.A. & Langdon, C.J. 1993. Effect of dietary protein content on growth of juvenile mussels, *Mytilus trossulus* (Gould, 1850). *Biol. Bull.* 185: 123-139.

Labarta, U.; Fernández-Reiriz, M.J. & Pérez-Camacho, A. 1999. Energy, biochemical substrates and growth in the larval development, metamorphosis and postlarvae of *Ostrea edulis* (L.). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 238: 225-242.

Laing, I. 1995. Effect of food supply on oyster spatfall. *Aquaculture*. 131: 315-324.

Laing, I. 2000. Effect of temperature and ration on growth and condition of king scallop (*Pecten maximus*) spat. *Aquaculture*. 183: 325-334.

Laing, I. & Millican, P.F. 1986. Relative growth and growth efficiency of *Ostrea edulis* L. spat fed various algal diets. *Aquaculture*. 54: 245-262.

Lalli, C.M. & Parsons, T.R. 1997. Biological Oceanography. An introduction, 2nd edition. The Open University, Reino Unido. 314 pp.

Langdon, C.J. 1982. New techniques and their application to studies of bivalve nutrition. pp: 272-291. En: Pruder, G.; Langdon, C.J. & Conklin, D.E. (ed). *Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and*

Physiological Approaches to Shellfish Nutrition, 2. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA.

Langdon, C.J. & Waldock, M.J. 1981. The effect of algal and artificial diets on the growth and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* spat. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 61: 431-448.

Langton, R.W.; Winter, J.E. & Roells, O.A. 1977. The effect of ration size on the growth and growth efficiency of the bivalve mollusc *Tapes japonica*. *Aquaculture*. 12: 282-292.

Leavitt, D. & Burt, W. 2001. The razor clam (*Ensis directus*) as a candidate for culture in the northeast: An introduction. *J. Shellfish Res.* 20: 522-523.

Leavitt, D.; Burt, W.; Murphy, D. & Hanson, R. 2002. Progress with culturing the razor clam (*Ensis directus*). *J. Shellfish Res.* 21: 345-346.

Leavitt, D.; Gardner, J.; Getchis, T.; Grunden, D.; Murphy, D.; O'Connell, J.; Patricio, M.; Surier, A.; Warsworth, J. & Burt, W. 2005. A preliminary investigation of the razor clam (*Ensis directus*) as a candidate for commercial farming. *J. Shellfish Res.* 24: 663.

Lee, R.F. 1991. Lipoproteins from the hemolymph and ovaries of marine invertebrates. pp: 187-208. En: Gille, R. (ed). *Advances in comparative and environmental physiology*, 7. Editorial Springer-Verlag, Londres, Reino Unido.

Lee, R.F. & Heffernan, P.B. 1991. Lipids and proteins in eggs of eastern oysters (*Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791)) and northern quahogs (*Mercenaria mercenaria* (Linnaeus, 1758)). *J. Shellfish Res.* 10: 203-206.

Lee, R.F.; Hagen, W. & Kattner, G. 2006. Lipid storage in marine zooplankton. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 307: 273-306.

Le Pennec, M. 1970. Elevages au laboratoire de Mollusque bivalves: morphogénèse de la coquille des Veneridae. *Tesis 3^{er} ciclo*. Paris, Francia. 95 pp.

Le Pennec, M. 1980. The larval and post-larval hinge of some families of bivalve molluscs. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 60: 601-612.

Le Pennec, M. 1981. Les méthodes expérimentales induisant la ponte chez les mollusques bivalves marins. *Haliotis*. 11: 139-155.

Le Pennec, M. & Coatanea, D. 1985. Production en éclosérie de l'huître océanienne *Saccostrea cucullata echinata* (Quoy et Gaimard, 1835); recherches sur la morphogénèse de la charnière. *Cah. Biol. Mar.* 26: 201-206.

Le Pennec, M.; Gueguen, F.; Cochard, J-C.; Paulet, Y-M. & Dorange, G. 1990. Relations entre le contenu lipidique des ovocytes de *Pecten maximus* (Mollusque, Bivalve) et les performances des larves en élevage. *Haliotis*. 10: 101-113.

- Lépez, I. 2006. El cultivo de la navaja chilena *Ensis macha*. VIII Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas. 347-349.
- Lépez, I.; Arriagada, D.; Padget, C.; Tarifeño, E.; Vega, A.; Riquelme, R. & Araya, J.M. 2005. Cultivo larval y postlarval de *Ensis macha* en ambiente controlado. Workshop Internacional. Estado Actual de la Biología y Cultivo de Bivalvos Enterradores. Concepción, Chile, 19-20 de abril.
- Lépez, I.; Véjar, F.E. & Arriagada, D. 2008. Cultivo de la navaja (*Ensis macha*) en Chile. pp: 213-221. En: Guerra, A. & Lodeiros, C. (ed). *Navajas y longueirones: biología, pesquerías y cultivo*. Xunta de Galicia, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Santiago de Compostela, A Coruña, España.
- Lin, D.S.; Connor, W.E. & Spenler, C.W. 1993. Are dietary saturated, monounsaturated and polyunsaturated fatty acids deposited to the same extent in adipose tissue of rabbits? *Am. J. Clin. Nutr.* 58: 174-79.
- Loosanoff, V. 1954. New advances in the study of bivalve larvae. *Am. Sci.* 42: 607-624.
- Loosanoff, V. & Davies, H.C. 1950. Conditioning *V. mercenaria* for spawning in winter and breeding its larvae in the laboratory. *Biol. Bull.* 98: 60-65.
- Loosanoff, V. & Davies, H.C. 1963. Rearing of bivalve larvae. *Avd. Mar. Biol.* 1: 1-136.
- Loosanoff, V.; Davies, H.C. & Chanley, P.E. 1966. Dimensions and shapes of larvae of some marine bivalve mollusks. *Malacologia*. 4: 351-435.
- Lorenzo, S.; Fuentes, J. & González-Fernández, A. 2003. Identification of *Mytilus galloprovincialis* larvae from the Galician rías by mouse monoclonal antibodies. *Aquaculture*. 219: 545-559.
- Lorenzo, S.; González-Fernández, A.; de Miguel, E. & Fuentes, J. 2005. Two monoclonal antibodies for the recognition of *Mytilus* spp. larvae: studies on cultured larvae and tests on plankton samples. *Aquaculture*. 250: 736-747.
- Lowry, H.O.; Rosebrough, N.J.; Farr, A.L. & Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin fenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Lucas, A. 1977. Culture of manila clam (*Venerupis semidecussata*, Reeve) from hatchery-reared spat. 3rd Meeting of the ICES Working Group on Mariculture. Brest, France, May 10-13. *Actes de Colloques du C.N.E.X.O.* 4: 317-330.
- Lucas, A.; Chebab-Chalabi, L. & Aldana Aranda, D. 1986. Pasaje de l'endotrophie à l'exotrophie chez les larves de *Mytilus edulis*. *Oceanol. Acta*. 9: 97-103.
- Madrones-Ladja, J.A. 1997. Notes on the induced spawning, embryonic and larval development of the window-pane shell, *Placuna placenta* (Linnaeus, 1758), in the laboratory. *Aquaculture*. 157: 137-146.

Maia, F.; Sobral, M.P. & Gaspar, M. 2006a. Ciclo reproductivo e primeira maturação de *Solen marginatus* e *Venerupis pullastra* na Ría de Aveiro. *Relatórios científicos e técnicos do IPIMAR*. 35 pp.

Maia, F.; Sobral, M.P.; Gaspar, M. & Pimenta, J. 2006b. Estudo do crescimento de *Solen marginatus* e de *Venerupis pullastra* na Ría de Aveiro. Bases científicas para a gestão de estes recursos. *Relatórios científicos e técnicos do IPIMAR*. 43 pp.

Malakhov, V.V. & Medvedeva, L.A. 1985. Embryonic development of *Crassostrea gigas*. *Biologiya Morya - Mar. Biol.* 1: 45-51.

Manahan, D.T. 1983. The uptake of dissolved glycine following fertilization of oyster eggs, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 68: 53-58.

Manahan, D.T. 1990. Adaptations by invertebrate larvae for nutrients acquisition from seawater. *Amer. Zool.* 30: 147-160.

Manahan, D.T. & Crisp, D.J. 1982. The role of dissolved organic material in the nutrition of pelagic larvae: amino acid uptake by bivalve larvae. *Amer. Zool.* 22: 635-646.

Manahan, D.T. & Crisp, D.J. 1983. Autoradiographic studies on the uptake of dissolved amino acids from sea water by bivalve larvae. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 63: 673-682.

Manahan, D.T. & Stephens, G.C. 1983. The use of high performance liquid chromatography to measure dissolved organic compounds in bivalve aquaculture systems. *Aquaculture*. 32: 339-346.

Mann, R. & Gallager, S.M. 1985. Physiological and biochemical energetics of larvae of *Teredo navalis* L. and *Bankia gouldi* (Bartsch) (Bivalvia: Teredinidae). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 85: 211-228.

Marsh, J.B. & Weinstein, D.B. 1966. Simple carrying method for determination of lipids. *J. Lipid Res.* 7: 574-576.

Martel, A.; Hynes, T.M. & Buckland-Nicks, J. 1995. Prodissoconch morphology, planktonic shell growth, and size at metamorphosis in *Dreissena polymorpha*. *Can. J. Zool.* 73: 1835-1844.

Martínez, D. 2002. Estudio de los Solénidos, *Solen marginatus* (Pennant, 1777) y *Ensis siliqua* (Linné, 1758), de los bancos naturales de la Ría de Ortigueira y Ría del Barquero: ciclo gametogénico, composición bioquímica y cultivo larvario. *Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela*. 240 pp.

Martínez, D.; Cerviño-Otero, A.; Louzán, A.; da Costa, F.; Ojea, J. & Nóvoa, S. 2008. Producción de especies de interés marisquero en la Planta de Cultivos de Ribadeo. *II Foro Iberoamericano de los Recursos Marinos y la Acuicultura*. Cumaná, Venezuela, 5-8 de noviembre.

- Martínez, D.; Nóvoa, S. & Ojea, J. 2001. Cultivo larvario y postlarvario de almeja fina (*Ruditapes decussatus*) y almeja babosa (*Venerupis senegalensis*) en criadero. *Actas de VIII Congreso Nacional de Acuicultura*. Santander. 304-306.
- Martínez, D.; Ojea, J.; Nóvoa, S. & Rodríguez, J.L. 2002. The relation between the oocyte quality of four species of bivalve molluscs and their rates of larval growth. *Abstracts Aquaculture Europe 2002. Special publication n° 32*. 333-334.
- Martínez, G. 1991. Seasonal variation in biochemical composition of three size classes of Chilean scallop *Argopecten purpuratus* Lamarck, 1819. *Veliger*. 34: 335-343.
- Martínez, G.; Aguilera, C. & Mettifogo, L. 2000. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture*. 183: 149-159.
- Martínez, I.; Pérez-Sanmartín, M.; Louro, A.; de la Roche, J.P.; Román, G. & Silva, A. 2005a. Estudio histológico de la zamburiña, *Chlamys varia*, durante el acondicionamiento. Efecto del fotoperíodo. *Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura*. Gandía, Valencia. 628-629.
- Martínez, I.; Silva, A.; Domínguez, L.; Álvarez-Fariña, P. & Sánchez, J.L. 2005b. Efecto combinado del fotoperíodo y la ración de alimento sobre el acondicionamiento de *Ruditapes decussatus*, Linné 1758, en criadero. *Actas del X Congreso Nacional de Acuicultura*. Gandía, Valencia. 520-521.
- Martínez-Patiño, D.; da Costa, F.; Cromie, A.; Nóvoa, S.; Ojea, J.; Werner, A.; Browne, L.; Fernández-Tajes, J.; Méndez, J.; Gaspar, M.; Constantino, R.; Roberts, D. & McDonough, N. 2007. Desarrollo de la acuicultura de navajas y longueirones: cultivo en criadero. *Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura*. Vigo, Pontevedra. 611-614.
- Marty, Y.; Delaunay, F.; Moal, J. & Samain, J.F. 1992. Changes in the fatty acid composition of *Pecten maximus* (L.) during larval development. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163: 221-234.
- Matthews, K.R.; Homer, D.B.; Thies, F. & Calder, P.C. 2000. Effect of whole linseed (*Linum jussitissimum*) in the diet of finishing pigs on growth performance and on the quality and fatty acid composition of various tissues. *Br. J. Nutr.* 83: 637-643.
- McDonough, N.A. & Patiño, D.M. 2005. Developing stock enhancement techniques for two razor clam species in the European Atlantic Area. *J. Shellfish Res.* 24: 329.
- Medeiros-Bergen, D.E.; Olson, R.R.; Conroy, J.A. & Kocher, T.D. 1995. Distribution of holoturian larvae determined with species-specific genetic probes. *Limno. Oceanogr.* 40: 1225-1235.
- Metcalf, L.D. & Schmitz, A.A. 1961. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatography analysis. *Anal. Chem.* 33: 363-364.

- Millard, R.H. & Scott, J.M. 1967. The larvae of the oyster *Ostrea edulis* during starvation. *J. Mar. Biol. Ass. U.K.* 47: 475-484.
- Miller, K.M.; Jones, P. & Roughgarden, J. 1991. Monoclonal antibodies as species-specific probes in oceanographic research: examples with intertidal barnacle larvae. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1: 35-47.
- Møhlenberg, F. & Riisgård, H.U. 1978. Efficiency of particle retention in 13 species of suspension feeding bivalves. *Ophelia*. 17: 239-246.
- Morse, D.; Hooker, N. & Morse, A. 1977. Hydrogen peroxyde induces spawning in mollusks with activation of Prostaglandin Endoperoxide synthetase. *Science*. 196: 298-300.
- Mortensen, S.H.; Borsheim, K.Y.; Rainuzzo, J.R. & Knutsen, G. 1988. Fatty acid and elemental composition of the marine diatom *Chaetoceros gracilis* Schütt: Effect of silicate deprivation, temperature and light intensity. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 122: 173-185.
- Mouëza, M.; Gros, O. & Frenkiel, L. 1999. Embryonic, larval and postlarval development of the tropical clam, *Anomalocardia brasiliana* (Bivalvia: Veneridae). *J. Moll. Stud.* 65: 73-88.
- Mouëza, M.; Gros, O. & Frenkiel, L. 2006. Embryonic development and shell differentiation in *Chione cancellata* (Bivalvia: Veneridae): an ultrastructural analysis. *Invertebr. Biol.* 125: 21-33.
- Muranaka, M.S. & Lannan, J.E. 1984. Broodstock management of *Crassostrea gigas*: environmental influences on broodstock conditioning. *Aquaculture*. 39: 217-228.
- Napolitano, G.E.; Ackman, R.G. & Ratnayake, W.M.N. 1990. Fatty acid composition of three cultured algal species (*Isochrysis galbana*, *Chaetoceros gracilis* and *Chaetoceros calcitrans*) used as food for bivalve larvae. *World Aquaculture Society*. 21 pp.
- Napolitano, G.E.; MacDonald, B.A.; Thompson, R.J. & Ackman, R.G. 1992. Lipids composition of eggs and adductor muscle in giant scallops (*Placopecten magellanicus*) from different habitats. *Mar. Biol.* 113: 71-76.
- Napolitano, G.E.; Ratnayake, W.M.N. & Ackman, R.G. 1988. Fatty acid components of larval *Ostrea edulis* (L.): importance of triacylglycerols as a fatty acid reserve. *Comp. Biochem. Physiol.* 90B: 875-883.
- Nascimento, I.A. 1980. Growth of the larvae of *Crassostrea gigas* Thunberg, fed with different algal species at high cell concentrations. *J. Cons. Int. Explor. Mer.* 39: 134-139.
- Nóvoa, S. 2007. Metabolismo lipídico, ácidos grasos en el cultivo larvario de almeja babosa, *Venerupis pullastra* (Montagu, 1803). "Calidad ovocitaria, larvaria y nutricional con una aproximación al uso de la microencapsulación lipídica". *Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela*. 244 pp.

- O'Connor, W.A. & Heasman, M.P. 1997. Diet and feeding regimens for larval doughboy scallops, *Mimachlamys asperima*. *Aquaculture*. 158: 289-303.
- Ockelmann, K.W. 1965. Developmental types in marine bivalves and their distribution along the Atlantic coasts of Europe. pp: 25-35. En: Cox, L.R. & Peake, J.F. (ed). *Proc. First Eur. Malacological Congr.* Conchological Society G.B. and Ireland, and Malacological Society. Londres, Reino Unido.
- Ojea, J.; Nóvoa, S.; Martínez, D. & Rodríguez, J.L. 1999. Evaluación de la calidad nutritiva del fitoplancton en tres sistemas de cultivo empleados en criaderos de moluscos. *Actas del VII Congreso Nacional de Acuicultura*. Gran Canaria. 317-322.
- Ojea, J.; Silva, A., Martínez, D.; Nóvoa, S.; García-Martínez, P. & Abad, M. 2007. Condiciones óptimas para el acondicionamiento de la almeja fina, *Ruditapes decussatus* (Linnaeus, 1758) en criadero. *Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura*. Vigo, Pontevedra. 391-394.
- Olson, R.R.; Rucstadler, J.A. & Kocher, T.D. 1991. Whose larvae? *Nature*. 351: 357-358.
- Pandian, T.J. 1969. Yolk utilization in the gastropod *Crepidula fornicata*. *Mar. Biol.* 3: 117-121.
- Paradis, M. & Ackman, R.G. 1977. Potential for employing the distribution of anomalous non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in several marine invertebrates as part of food web studies. *Lipids*. 12: 170-176.
- Paugam, A.; Le Pennec, M. & Geneviève, A.F. 2000. Immunological recognition of marine bivalve larvae from plankton samples. *J. Shellfish Res.* 19: 325-331.
- Paulet, Y.M. & Broucher, J. 1991. Is reproduction mainly regulated by temperature or photoperiod in *Pecten maximus*? *Invert. Rep. Dev.* 19: 61-70.
- Pauly, D. & Christensen, V. 1995. Primary production required to sustain global fisheries. *Nature*. 374: 219-240.
- Pazos, A.J.; Ruiz, C.; García-Martín, O.; Abad, M. & Sánchez, J.L. 1996. Seasonal variations of the lipid content and fatty acid composition of *Crassostrea gigas* cultured in El Grove, Galicia; NW Spain. *Comp. Biochem. Physiol.* 114B: 171-179.
- Pérez-Camacho, A. & Román, G. 1987. La reproducción en los moluscos bivalvos. pp: 133-184. En: Espinosa, J. & Labarta, U. (ed). *Reproducción en la Acuicultura*. Plan de Formación de Técnicos Superiores en Acuicultura (FEUGA). Madrid.
- Pernet, F.; Tremblay, R. & Bourget, E. 2003. Biochemical indicator of sea scallop (*Placopecten magellanicus*) quality based on lipid class composition. Part I. Broodstock conditioning and young larval performance. *J. Shellfish Res.* 22: 365-375.

- Raleigh, J. & Keegan, B.F. 2007. Embryonic development in the bivalve *Scrobicularia plana* (Semelidae) using scanning electron microscopy. *Invert. Reprod. Develop.* 50: 139-144.
- Redfearn, P. 1982. Larval shell development of the toheroa, *Phapies ventricosa* (Bivalvia: Mesodesmatidae). *New Zealand J. Mar. Freshw. Res.* 16: 241-252.
- Redfearn, P. 1987. Larval shell development of the northern tuatua, *Phapies subtringulata* (Bivalvia: Mesodesmatidae). *New Zealand J. Mar. Freshw. Res.* 21: 65-70.
- Redferan, P.; Chanley, P. & Chanley, M. 1986. Larval shell development of four species of New Zealand mussels: (Bivalvia: Mytilacea). *New Zealand J. Mar. Freshw. Res.* 20: 157-172.
- Richardson, C.A.; Crisp, D.J. & Runham, N.W. 1979. Tidally deposited growth bands in the shell of the common cockle *Cerastoderma edule* (L.). *Malacologia.* 18: 277-290.
- Robinson, A. 1992. Gonadal cycle of *Crassostrea kumamoto* (Thunberg) in Yaquina bay, Oregon and optimum conditions for broodstock oysters and larval culture. *Aquaculture.* 99: 277-284.
- Robinson, R.F. & Richardson, C.A. 1998. The direct and indirect effects of suction dredging on a razor clam (*Ensis arcuatus*) population. *ICES J. Mar. Sci.* 55: 970-977.
- Rodríguez, J.L.; Sedano, F.J.; García-Martín, L.O.; Pérez-Camacho, A. & Sánchez, J.L. 1990. Energy metabolism of newly settled *Ostrea edulis* spat during metamorphosis. *Mar. Biol.* 106: 109-111.
- Román, G. 1989. Efecto del ciclo reproductivo y acondicionamiento en el desarrollo larvario, fijación y posterior crecimiento de semilla de *Ostrea edulis* Linné, 1758. *Tesis Doctoral. Univ. de Santiago de Compostela.* 341 pp.
- Román, G. & Pérez-Camacho, A. 1976. Cultivo de larvas de vieira, *Pecten maximus* (Linnaeus), en laboratorio. *Bol. Inst. Espa. Océano.* 223. 1-17.
- Ropes, J.W.; Murawski, S.A. & Serchuk, F.M. 1984. Size, age, sexual maturity and sex ratio in ocean quahogs, *Arctica islandica* Linne. Off LongIsland, New York. *Fish. Bull. U.S.* 82: 253-267.
- Royo, A. & Ruiz-Azcona, P. 2005. Incidencia de la densidad en el engorde de almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum* Adams & Reeve, 1850) en la zona intermareal. pp: 229-233. En: *Actas del IX Congreso Nacional de Acuicultura* (13-16 de mayo, 2003, Cádiz). Consejería de Agricultura y Pesca, Junta de Andalucía, Sevilla.
- Sastry, A.N. 1966. Temperature effects in reproduction in the bay scallop, *Aequipecten irradians* Lamarck. *Biol. Bull.* 130: 118-133.
- Sastry, A.N. 1968. The relationship among food, temperature and gonad development of the bay scallop *Aequipecten irradians* Lamarck. *Physiol. Zool.* 41: 44-53.

- Sastry, A.N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae). pp: 113-292. En: Giese, A.C. & Pearse, J.S. (ed). *Reproduction of marine invertebrates, vol. 5, Molluscs: Pelecypods and lesser classes*. Academic Press, Nueva York, USA.
- Sedano, F.J. 1992. Contribución al estudio del metabolismo energético durante los desarrollos embrionario y larvario en *Mytilus galloprovincialis* Lamark. *Tesis doctoral. Univ. de Santiago de Compostela*. 243 pp.
- Short, G. & Tamm, S.L. 1991. On the nature of paddle cilia and discocilia. *Biol. Bull.* 180: 466-474.
- Silva, A.; Nóvoa, S.; Sordo, A.; Abad, M. & Sánchez, J.L. 2002. The influence of photoperiod on hatchery conditioning of broodstock of the clam *Ruditapes decussatus*. *Abstracts Aquaculture Europe 2002. Special publication n° 32*. 479-480.
- Sokal, R.R. & Rohlf, F.J. 1995. *Biometry. The principles and practice of statistics in biological research*. Third edition. Freeman, Nueva York, USA. 358 pp.
- Soudant, P. 1995. Les phospholipides et les sterols des geniteurs et des larves de coquille Saint Jacques *Pecten maximus* (L.). Relations avec la nutrition. *Thèse de doctoral. Univ. de Brest*. 277 pp.
- Soudant, P.; Van Ryckeghem, K.; Marty, Y.; Moal, J.; Samain, J.F. & Sorgeloos, P. 1999. Comparison of the lipid class and fatty acid composition between reproductive cycle in nature and a standard hatchery conditioning of the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 123B: 209-222.
- Stephenson, R.L. & Chanley, P.E. 1979. Larval development of the cockle *Chione stutchburyi* (Bivalvia: Veneridae) reared in laboratory. *New Zeal. J. Zool.* 6: 553-560.
- Sukenik, A.; Carmeli, Y. & Berner, T. 1989. Regulation of fatty acid composition by growth irradiance level in the eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycol.* 25: 686-692.
- Sullivan, C.M. 1948. Bivalve larvae of Malpeque Bay, P.E.I. *Bull. Fish. Res. Bd., Canada*. 77: 1-36.
- Swennen, C.; Leopold, M.F. & Stock, M. 1985. Notes on growth and behaviour of the American razor clam *Ensis directus* in the Wadden Sea and the predation on it by birds. *Helgol. Meeresuntersuchungen*. 39: 255-261.
- Tardy, J. & Dongard, S. 1993. Le complexe apical de la véligère de *Ruditapes philippinarum* (Adams et Reeve, 1850) Mollusque Bivalve Vénéridé. *C. R. Acad. Sci. Ser. 3*. 316: 177-184.
- Thompson, P.A. & Harrinson, P.J. 1992. Effect of monoespecific algal diets of varying biochemical composition on the growth and survival of Pacific oyster *Crassostrea gigas* larvae. *Mar. Biol.* 113: 645-654.

Thorson, G. 1946. Reproduction and larval development of danish marine bottom invertebrates. *Medd. Komm. Havunders. (Ser. Plankton)*. 4: 1-523.

Toro, J.E. 1998. Molecular identification of four species of mussels from southern Chile by PCR-based molecular markers: the potential use in studies involving planktonic surveys. *J. Shellfish Res.* 17: 1203-1205.

Trider, D.J. & Castell, J.D. 1980. Effects of dietary lipids on growth, tissue composition and metabolism of the oyster (*Crassostrea virginica*). *J. Nutr.* 110: 1303-1309.

Trocher, D.R.; Fraser, A.J.; Sargent, J.R. & Gamble, J.C. 1985. Lipid class composition during embryonic and early larval development in Atlantic herring (*Clupea harengus*, L.). *Lipids*. 20: 84-89.

Uki, N.; Sigiura, M. & Watanabe, T. 1986. Requirement of essential fatty acids in the abalone *Haliotis discus hannai*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 52: 1013-1023.

Urban, H.J. 1996. Populations dynamics of the bivalves *Venus antiqua*, *Tagelus dombeii*, and *Ensis macha* from Chile at 36°S. *J. Shellfish Res.* 43: 65-81.

Urban, H.J. 2002. Modelling growth of different developmental stages in bivalves. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 238: 109-114.

Utting, S.D. & Millican, P.F. 1997. Techniques for the hatchery conditioning of bivalve broodstock and the subsequent effect on egg quality and larval viability. *Aquaculture*. 155: 45-54.

Valli, G.; Mansotti, L.; Ceresi, R. & Nodari, P. 1985. Considerazioni sul ciclo riproduttivo e sulla biometria di *Ensis minor* (Chenu) (Mollusca, Bivalvia) del Golfo di Trieste (Alto Adriatico) dopo un triennio di studio. *Nova Thalassia*. 7: 5-38.

Verdonk, N.H. & Van den Biggelaar, J.A.M. 1983. Early development and the formation of germ layers. pp: 91-134. En: Verdonk, N.H.; Van den Biggelaar, J.A.M. & Tompa, A.S. (ed). *The Mollusca, Vol. 3, Development*. Academic Press, Nueva York, USA.

Volkman, J.K.; Jeffrey, S.W.; Nichols, P.D.; Rogers, G.I. & Garland, C.D. 1989. Fatty acid and lipid composition of 10 species of microalgae used in mariculture. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 128: 219-240.

Waldock, M.J. & Holland, D.L. 1984. Fatty acid metabolism in young oysters, *Crassostrea gigas*: polyunsaturated fatty acids. *Lipids*. 19: 332-336.

Waldock, M.J. & Nascimento, I.A. 1979. The triacylglycerol composition of *Crassostrea gigas* larvae fed on different algal diets. *Mar. Biol. Lett.* 1: 77-86.

Waller, T.R. 1981. Functional morphology and development of the veliger larvae of the European oyster *Ostrea edulis* Linné. *Smithson. Contrib. Zool.* 123: 63.

Walne, P.R. 1966. Experiments in the large-scale culture of the larvae *Ostrea edulis* L. *Fish. Invest. Min. Agric. Fish. Food (G.B.). Ser 2.* 25: 53 pp.

Walne, P.R. 1970. Studies on the food value of nineteen genera of algae to juvenile bivalves of the genera *Ostrea*, *Mercenaria* and *Mytilus*. *Fish. Invest. Min. Agric. Fish. Food (G.B.). Ser 2.* 25: 1-62.

Webb, K.L. & Chu, F.L. 1982. Phytoplankton as a food source for bivalve larvae. pp: 272-291. En: Pruder, G.; Langdon, C.J. & Conklin, D.E. (ed). *Proceedings of the Second International Conference on Aquaculture Nutrition: Biochemical and Physiological Approaches to Shellfish Nutrition*, 2. Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA.

Whyte, J.N.C. 1987. Biochemical composition and energy content of six species of phytoplankton used in mariculture of bivalves. *Aquaculture*. 60: 231-241.

Whyte, J.N.C. 1988. Fatty acid profiles from direct methanolysis of lipids of cultured species. *Aquaculture*. 75: 193-203.

Whyte, J.N.C.; Bourne, N. & Hodgson, C.A. 1987. Assessment of biochemical composition and energy reserves in larvae of the scallop *Patinopecten yessoensis*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 113: 113-124.

Whyte, J.N.C.; Bourne, N. & Hodgson, C.A. 1989. Influence of algal diets on biochemical composition and energy reserves in *Patinopecten yessoensis* (Jay) larvae. *Aquaculture*. 78: 333-347.

Whyte, J.N.C.; Bourne, N. & Ginther, N.G. 1990a. Biochemical and energy changes during embryogenesis in the rock scallop *Crassadoma gigantea* (Gray). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 106: 239-244.

Whyte, J.N.C.; Bourne, N. & Hodgson, C.A. 1990b. Nutritional condition of the rock scallop, *Crassadoma gigantea* (Gray), larvae fed mixed algal diets. *Aquaculture*. 86: 25-40.

Whyte, J.N.C.; Bourne, N. & Ginther, N.G. 1991. Depletion of nutrient reserves during embryogenesis in the scallop *Patinopecten yessoensis* (Jay). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 149: 67-79.

Whyte, J.N.C.; Bourne, N.; Ginther, N.G. & Hodgson, C.A. 1992. Compositional changes in the larva to juvenile development of the scallop *Crassadoma gigantea* (Gray). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 163: 13-29.

Wilbur, K.M. & Saleuddin, A.S.M. 1983. Shell formation. pp: 235-287. En: Saleuddin, A.S.M. & Wilbur, K.M. (ed). *The Mollusca*, vol. 4. Academic Press, Nueva York, USA.

Wilson, J.A.; Chaparro, O.R. & Thompson, R.J. 1996. The importance of broodstock nutrition on the viability of larvae and spat in the Chilean oyster *Ostrea chilensis*. *Aquaculture*. 139: 63-75.

Zar, J.H. 1996. *Biostatistical analysis. Third edition*. Prentice Hall Inc., Nueva Yersey, USA. 662 pp.

Zardus, J.D. & Morse, M.P. 1998. Embryogenesis, morphology and ultrastructure of the pericalymma larva of *Acila castrensis* (Bivalvia: Protobranchia: Nuculoida). *Invertebr. Biol.* 117: 245-252.

Zhukova, N.V. 1986. Biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids from ^{14}C -acetate in mollusks. *Bioquim. Biophys. Acta.* 878: 131-133.

Zhukova, N.V. 1991. The pathway of biosynthesis of non-methylene-interrupted dienoic fatty acids in mollusks. *Comp. Biochem. Physiol.* 100B: 801-804.

Zobell, C.E. & Anderson, D.Q. 1936. Observations on the multiplication of bacteria in different volumes of stored sea water and the influence of oxygen tension and solid surfaces. *Biol. Bull.* 71: 324-342.

IX. Anexos: Publicaciones

IX. ANEXOS: PUBLICACIONES

EMBRYONIC AND LARVAL DEVELOPMENT OF *ENSIS ARCUATUS*
(JEFFREYS, 1865) (BIVALVIA: PHARIDAE)

FIZ DA COSTA, SUSANA DARRIBA AND DOROTEA MARTÍNEZ-PATIÑO

Centro de Investigacións Mariñas, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Xunta de Galicia, Apdo. 94, 27700 Ribadeo, Lugo, Spain

(Received 5 December 2006; accepted 19 November 2007)

ABSTRACT

The razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) is distributed from Norway to Spain and along the British coast, where it lives buried in sand in low intertidal and subtidal areas. This work is the first study to research the embryology and larval development of this species of razor clam, using light and scanning electron microscopy. A new method, consisting of changing water levels using tide simulations with brief dry periods, was developed to induce spawning in this species. The blastula was the first motile stage and in the gastrula stage the vitelline coat was lost. The shell field appeared in the late gastrula. The trochophore developed by about 19 h post-fertilization (hpf) (19°C). At 30 hpf the D-shaped larva showed a developed digestive system consisting of a mouth, a foregut, a digestive gland followed by an intestine and an anus. Larvae spontaneously settled after 20 days at a length of 378 µm.

INTRODUCTION

Ensis arcuatus (Jeffreys, 1865) is the most abundant species of Pharidae in Spain. Its commercial value has increased considerably in recent years. *Ensis arcuatus* lives buried in sand in low intertidal and subtidal zones from Norway to Spain and it is also found along the British coast (Hayward & Ryland, 1998).

The accurate identification of bivalve larvae and post-larvae in planktonic and benthic samples is essential to both basic and applied research efforts in estuarine and open coastal marine environments (Gustafson & Lutz, 1992). Identification of planktonic larvae is crucial for investigating larval dispersion, settlement events, levels of recruitment and growth rates of infaunal bivalves (Gribben & Hay, 2003). Positive larval identification can only be verified by direct techniques such as larval culture (Chanley & Andrews, 1971). The use of shell morphometrics such as length, height and thickness has proved useful in identifying larvae (Gribben & Hay, 2003). However, some closely related species present similar valve structures, making species identification difficult (Le Pennec, 1980; Fuller & Lutz, 1989), and more so if several species of the same family live in the same area. Some studies on bivalve larval development have proposed that the internal structure and morphology of the valves and soft parts of the larvae show specific differences (Elston, 1980; Cragg, 1985, 1989; Hodgson & Burke, 1988). Moreover, characters that can be easily detected by light microscopy can also contribute to larval identification. In recent years, alternative methods showing accuracy, specificity and speed have been used for field studies. Molecular methods such as DNA-based (André *et al.*, 1999; Hare, Palumbi & Butman, 2000) and immunological methods (Lorenzo, Fuentes & González-Fernández, 2003; Lorenzo *et al.*, 2005) show considerable promise for the identification of bivalve larvae. These methods do not contribute toward the improvement of hatchery larval culture, however, because larval morphology cannot be ascertained nor abnormal larvae identified.

Larval development has been described in several species of Eulamellibranchia, providing basic knowledge for aquaculture and for identification of larval stages in the plankton (Loosanoff & Davies, 1963; Loosanoff, Davies & Chanley, 1966). With scanning electron microscopy (SEM) different aspects of larvae and post-larvae have been studied in several species of the

following families: Mytilidae (Redfearn, Chanley & Chanley, 1986; Fuller & Lutz, 1989; Bellolio, Toledo & Dupré, 1996; Hanyu *et al.*, 2001), Ostreidae (Le Pennec & Coatanea, 1985; Hu *et al.*, 1993; Chaparro, Thompson & Emerson, 1999), Pectinidae (Cragg, 1985, 1989; Bellolio, Lohrmann & Dupré, 1993; Benninger, Dwiono & Le Pennec, 1994; Casse, Devauchelle & Le Pennec, 1998) and Veneridae (Goodsell *et al.*, 1992; Mouëza, Gros & Frenkiel, 1999, 2006). However, embryonic development cannot be ascertained in detail using light microscopy, and much of the research undertaken on bivalve developmental patterns lacks descriptions of the early stages (Verdonk & Van den Biggelaar, 1983).

The aim of this study was to describe the developmental pattern of the razor clam *E. arcuatus*, from hatching to metamorphosis, using light and scanning electron microscopy. Knowledge of *E. arcuatus* embryology and larval development is necessary to obtain characters for the planktonic and benthic identification of samples and to improve larval rearing in hatcheries.

MATERIAL AND METHODS

Larval culture

Fifty individuals greater than 100 mm in length were collected by skin-diving from a natural bed in a subtidal zone of Cies Islands in Ría de Vigo (Galicia, NW Spain). At Centro de Cultivos de Ribadeo-CIMA, razor clams were held in row bars tied individually with rubber bands in open circuit.

Razor clams were taken from the holding tank for spawning and placed in groups of 25 individuals into 200-l tanks. Four different stimulations along with a control were used to induce spawning: thermal shock with addition of microalgae and gonad extracts; changing water level by simulating tides, with brief dry periods; stripping gonads; and UV-treated seawater flow. The specimens responding to the stimulus were separated into individual receptacles for the release of sperm or eggs, thus avoiding self-fertilization. After fertilization, the eggs were sieved to eliminate excess sperm.

Gametes were then transferred to 500-l larval culture tanks with aerated water at a temperature of 19 ± 1°C. Water was changed every 2 days using 1 µm filtered, UV-sterilized seawater. D-stage veliger larvae were fed daily with *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri* and *Chaetoceros calcitrans* at 40 cells/µl as initial ration.

Correspondence: F. da Costa; e-mail: fiz@cimacoron.org

Electron microscopy

Throughout embryonic development, in each stage at least 100 individuals were collected and photographed using an optical microscope. Eggs and larval stages were measured ($n = 100$). Samples were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer solution. After rinsing in cacodylate buffer, embryos were dehydrated in an ascending series of ethanol washes and critical point-dried using CO₂. Embryos were then sputter-coated with gold before observation in a Philips XL30 SEM.

Confirmation of prodissoconch structure in *Ensis arcuatus* was achieved using live 5-day-old larvae by cryofocusing, in which live larvae were frozen in liquid nitrogen to avoid the alteration of larval structures after SEM preparation procedures. Live larvae were placed in a cavity of a cylindrical aluminum plate and the plate was then submerged in liquid nitrogen for 5 min. During cryotransfer to the SEM, larvae were shielded in a Bal-Tec VCT100 cryoholder. A JEOL JSM-6700F microscope was used to study larval morphology. The cryoholder was inserted into the microscope and the larvae/larval chamber was pumped for about 10 min to remove water vapour. Specimens were studied at -160°C .

RESULTS

Adult individuals of *Ensis arcuatus* spawned in the hatchery from January until April. Neither thermal shock, stripping gonads, nor UV-treated seawater flow were effective as spawning methods. Changing water levels by simulating tides was the only successful method, the first individuals spawning 2 h after the beginning of induction. In our experience, six females out of a batch of 25 individuals spawned, each female releasing approximately 1 million eggs.

Unfertilized eggs of *E. arcuatus* were brown, spherical and had a mean diameter of $70.96 \pm 4.29 \mu\text{m}$ (Fig. 1A). The eggs had a 1- μm -thick vitelline coat and no prominent jelly coat. Table 1 shows the different embryonic stages of *E. arcuatus* and the times at which they occurred. The cleavage observed was spiral, unequal and slightly asynchronous from the four-cell stage. The first polar body appeared 15 min after oocyte and sperm contact ($T_0 + 15 \text{ min}$), and the second one was detected a few minutes later, but it was not always obvious (Fig. 1B). Both polar bodies measured approximately $8 \mu\text{m}$. The first cleavage was accompanied by the formation of a big polar lobe at the vegetal pole of the eggs. During division, this protrusion gradually constricted until it was connected only by a narrow stalk to the remainder of the egg, which in the meantime divided into two equal blastomeres ($30 \mu\text{m}$) and the polar lobe ($50 \mu\text{m}$), forming the trefoil stage (Fig. 1C). Subsequently, the polar lobe fused with the blastomere to which it was still attached. Hence, a two-cell stage consisting of two blastomeres of unequal size was obtained; the bigger one, called CD, fused with the polar lobe and measured $60 \mu\text{m}$; the other, called AB, deprived of lobe material, measured $50 \mu\text{m}$ in diameter (Fig. 1D). One hour post-fertilization (hpf) ($T_0 + 1 \text{ h}$) the two-cell stage was completed, showing a polar body located in the plane of cleavage. The four-cell stage consisted of three equal blastomeres (A, B and C) and a bigger one called D, showing two polar bodies (Fig. 1E). The eight-cell stage appeared with seven micromeres located in the animal pole over a macromere, with polar bodies still in this stage (Fig. 1F). Most of the embryos reached the 16-cell stage after 4 hpf. In the stages between 32 and 64 cells (Fig. 1G), the macromere was slowly covered by micromeres to produce a ciliated blastula after 8–12 hpf. This blastula was the first motile stage in the development and retained a protective coat that soon detached. A ciliated gastrula, with cilia of 10–12 μm in

length, was produced by epiboly and the vitelline coat no longer surrounded it (Fig. 1H). Originally located at the vegetal pole, the blastopore was displaced to the ventral side of the embryo during gastrulation. In the late gastrula the circular margin of the blastopore presented some cilia, and on the dorsal side a groove called the 'shell field' was located opposite the blastopore (Fig. 2A).

After 19 h ($T_0 + 19 \text{ h}$) the late gastrula had differentiated into a typically pyriform trochophore, measuring approximately $60 \mu\text{m}$ in length, swimming actively in the water column (Fig. 2B). The trochophore had a crown of motile cilia, called the prototroch, which divided the trochophore into two areas. The area posterior to the prototroch was occupied by the blastopore, which differentiated into the mouth on the ventral side and the shell field, which was surrounded by a ciliary tuft, on the dorsal side. The newly secreted shell material spread out, and folded into right and left segments connected by a thicker band, representing the first hinge. Behind it, in the postero-dorsal region, a tuft of cilia dorsal to the anus represented the telotroch. The anterior area constituted an apical plate with the long ciliary tuft of the apical flagellum at its centre, formed by a group of associated cilia with a length of $12 \mu\text{m}$.

Typical straight-hinged D-shaped larvae developed from a trochophore by 30 hpf and these were $109.36 \pm 10.03 \mu\text{m}$ long (Fig. 2C). The prodissoconch I progressively enclosed the soft body parts, but the time of calcification was not observed. From straight-hinged larvae to metamorphosis, a wrinkled pellicle was seen over the valves in samples prepared for SEM. Confirmation of prodissoconch structure in *E. arcuatus* using live 5-day-old larvae by cryofocusing showed prodissoconch I and II (Fig. 2D). The surface of prodissoconch I presented a punctate pattern and prodissoconch II commarginal growth lines.

The larval velum, oval-shaped with a few rows of cilia measuring $10 \mu\text{m}$ in length, was observed from the straight-hinged stage. The apical tuft with a length of 30–50 μm was observed in the straight-hinged larvae, but soon disappeared.

At 30 hpf the 'D' larva had a developed digestive system, consisting of a mouth, a foregut, a digestive gland followed by an intestine, and an anus (Fig. 2C). The post-anal tuft of a few simple cilia was dorsal to the anus. The mantle cavity was evident at this stage of development.

Seven-day-old larvae, which became oval in shape, were slightly umbonate, with a length of $177.96 \pm 19.73 \mu\text{m}$. Fourteen days after fertilization, they reached the pediveliger stage, with a size of $283.14 \pm 30.01 \mu\text{m}$, crawling and swimming for short intervals, with the velum still functional (Fig. 2E). During metamorphosis the velum could be shed completely as one unit or could be deciliated gradually before being histolyzed, and gill development began. Twenty-day-old larvae settled when a size of $378.81 \pm 37.08 \mu\text{m}$ was reached. In post-larvae a punctate pattern was observed on prodissoconch I and commarginal growth lines on prodissoconch II. The growth of the dissoconch was also observed (Fig. 2F).

DISCUSSION

This is the first study on the embryology and larval morphology of the razor clam *Ensis arcuatus* using light and scanning electron microscopy. Although numerous studies have investigated various aspects of larval morphology, such as velum structure, shell morphology or larval biology in other bivalve families (Hodgson & Burke, 1988; Cragg, 1989; Casse *et al.*, 1998; Mouëza *et al.*, 1999, 2006), this is the first study on a species of Pharidae.

The lack of efficient artificial stimuli to induce spawning still hinders the controlled development of several bivalve species (Mouëza *et al.*, 1999). Temperature fluctuation successfully induced spawning in some venerid clams (for review, see

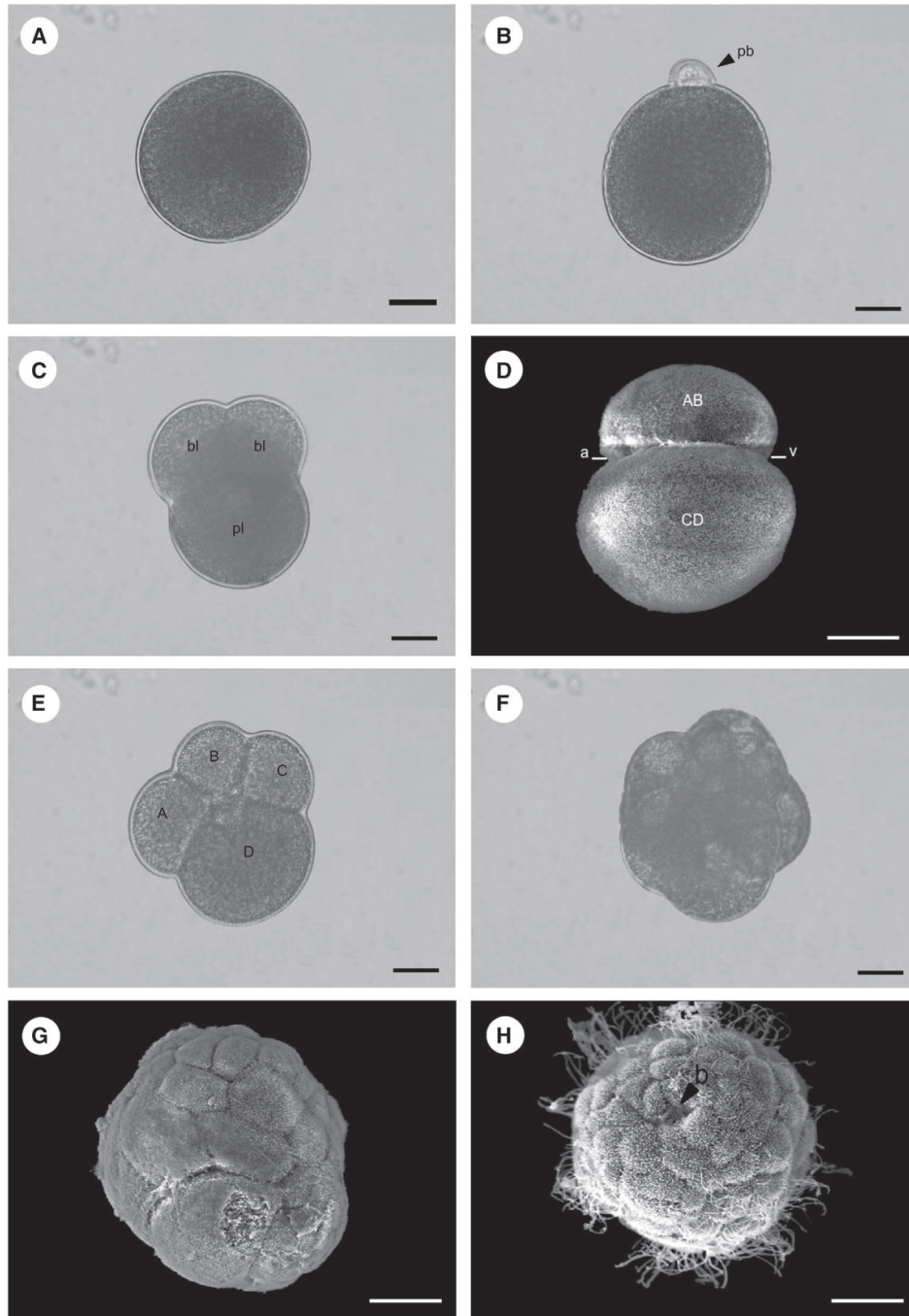
LARVAL DEVELOPMENT OF *ENSIS*

Figure 1. Development of *Ensis arcuatus*. **A–C, E–F.** Light micrographs. **D, G–H.** Scanning electron micrographs. **A.** Spawned egg (T₀). **B.** A fertilized egg just after spawning with a polar body (T₀ + 20 min). **C.** First cleavage with polar lobe formation, the trefoil stage, showing two blastomeres and polar lobe (T₀ + 1 h). **D.** Lateral view of two-cell stage, with larger CD cell than AB (T₀ + 1 h). **E.** Lateral view of four-cell stage. Macromere D is covered by micromeres A, B and C, with a polar body in the middle (T₀ + 1 h 30 min). **F.** Lateral view of eight-cell stage (T₀ + 2 h). **G.** Lateral view of 16- to 32-cell stage (T₀ + 4 h). **H.** Ciliated gastrula showing blastopore opening and short microvilli (T₀ + 16 h). Abbreviations: a-v, animal-vegetal axis; b, blastopore opening; bl, blastomere; pb, polar body; pl, polar lobe. Scale bars = 20 μm.

Table 1. Different embryonic stages in *Ensis arcuatus* reared at $18 \pm 1^\circ\text{C}$.

| Time post-fertilization | Stage |
|-------------------------|---|
| 0 h | Unfertilized egg |
| 1 h | 2-cell |
| 1 h 30 min | 4-cell |
| 2 h | 8-cell |
| 4 h | 16-cell |
| 6 h | 32-cell |
| 8–12 h | Blastula |
| 16 h | Gastrula |
| 19 h | Trochophore |
| 20–24 h | Transition between trochophore and D-shaped larva |
| 30 h | D-shaped larva |
| 7 d | Umbonate larva |
| 14 d | Pediveliger |
| 20 d | Post-larva |

Stephenson & Chanley, 1979), but it was not efficient for most species, even in the same family (D'Asaro, 1967), nor in *E. arcuatus*. In other razor-clam species the methods developed for other molluscs have likewise not proved effective (Breese & Robinson, 1981). Loosanoff & Davies (1963), using *E. directus*, found that by increasing the temperature from 13 to 25°C males would spawn and continue to release sperm even after they were cooled to 13°C . The success of fertilizing eggs stripped from conditioned females depended on the degree of their ripeness (Loosanoff & Davis, 1963). Early in the season, when the largest egg was only $66\ \mu\text{m}$, none were fertilizable. Later, when the razor clams were riper, a large percentage of stripped eggs underwent cleavage, but most of the larvae were abnormal. In *Siliqua patula* Breese & Robinson (1981) used the stripping method and reared with high microalgal concentration of *Pseudoisochrysis paradoxa*; this yielded 6–60% straight-hinged larvae. But in *E. arcuatus* no fertilization was obtained by stripping gonads.

In this work a new method was developed to induce spawning in *E. arcuatus*. Changing water levels by simulating tides, with brief dry periods, caused spawning in this razor clam. Thermal shock was not an effective stimulus to spawn razor clams, as observed in the wild population. Gamete release occurs between January and May, when the temperature is low in natural beds. Adult individuals reach the resting stage when the temperature of seawater is beginning to increase (Darriba, San Juan & Guerra, 2004).

The oocyte size of *E. arcuatus* is similar to that found for other razor clam species, such as *E. directus* (Loosanoff & Davies, 1963; Loosanoff et al., 1966) and *E. siliqua* (Martínez, 2002). These species have medium-sized eggs and a limited yolk supply, typical of planktotrophic development, as observed with venerid species (Ockelmann, 1965). However, the razor clam *Solen marginatus* is surrounded by a $30\text{-}\mu\text{m}$ -thick and $150\text{-}\mu\text{m}$ -diameter egg capsule (Martínez, 2002). In *S. marginatus* the thick chorion must have a fluid membrane to allow trochophores to swim inside and also a lipid droplet to provide energy for embryonic development (personal observation). Carriker (1967) suggested that the presence of this jelly coat is an adaptation to fluctuating estuarine environments. This brood protection is an adaptation to osmotic pressure changes and pollution in the environment in *Scrobicularia plana* (Frenkiel & Mouëza, 1979).

The polar lobe seems crucial for normal embryonic development and it is generally assumed that the occurrence of a polar lobe is

independent of the systematic position of a species (Verdonk & Van den Biggelaar, 1983). These authors reported that many Lamellibranchia have a polar lobe, e.g. *Mytilus*, *Crassostrea*, *Ostrea* and *Ensis*, but other species show unequal cleavage without the formation of a lobe, e.g. *Spisula* and *Dreissena*. As previously reported for *Ensis*, a big polar lobe found in *E. arcuatus* is related to yolk content. Prominent polar lobes are formed prior to each of the first two cleavages in *E. directus* (Costello & Henley, 1971). No correlation seems to exist between egg yolk content and polar lobe size, while in related species, however, the lobe is generally of the same relative size (Verdonk & Van den Biggelaar, 1983). This may be the case in *Ensis* species.

At the gastrula stage the vitelline coat is lost in *E. arcuatus*. As reported by Costello & Henley (1971) for *E. directus* a thin vitelline coat is also present until the gastrula stage. The presence of the vitelline coat is variable in the family Veneridae. In *Mercenaria mercenaria* the embryo is surrounded by a jelly coat which disappears generally between the blastula and the trochophore stage (Loosanoff & Davis, 1950). In *Venus striatula* a similar gelatinous coat surrounding the eggs, which become free-swimming larvae, is shed at the trochophore stage (Ansell, 1961). In *Chlamys hastata* it disappears at the gastrula stage (Hodgson & Burke, 1988). However, in other species it is retained during the trochophore stage until the beginning of the development of a straight-hinged larva, as in *Scrobicularia plana* (Frenkiel & Mouëza, 1979), *Codakia orbicularis* (Alatalo, Berg & D'Asaro, 1984; Gros, Frenkiel & Mouëza, 1997), *Argopecten purpuratus* (Bellolio et al., 1993) and in the razor clam *S. marginatus* (personal observation).

Traditionally, authors working on shell differentiation during embryonic development of bivalves have reported the invagination process described by Stepanoff (in Kniprath, 1980). In *Mytilus galloprovincialis* (Kniprath, 1980) and *Pecten maximus* (Casse et al., 1998) invagination needs to close either completely before the shell formation, or partially as for *Spisula solidissima* (Eyster & Morse, 1984). These bivalve studies are based on a process described for gastropods (Kniprath, 1980). However, Mouëza et al. (2006), studying *Chione cancellata*, proposed an alternate interpretation of shell differentiation, which appears at the trochophore stage as an independent phenomenon. A comparative TEM and SEM analysis shows that morphogenetic movements place the shell field in a dorsal position below the future prototroch, which develops a pad of ciliated cells overhanging the shell field. The shell field, which includes both shell- and ligament-secretory cells, does not migrate inward and never undergoes invagination by itself. The prototrochal pad and the shell field constitute an open cavity, at the far end of which they are in close contact. In our study the pattern of shell differentiation in *E. arcuatus* could not be ascertained, hence TEM preparations with sequential sampling to confirm which interpretation is correct should be made in the future.

Ensis directus embryonic development at $27\text{--}30^\circ\text{C}$ is faster than in *E. arcuatus* at 19°C , reaching the trochophore stage in 12 h and D-shape larva in 27 h (Costello & Henley, 1971). This may be due to the effect of the higher temperature.

The apical tuft, made up of long non-motile cilia, conspicuous from the trochophore up to the veliger stage, is a common structure in numerous bivalve species (Mouëza et al., 1999). It has been considered a sense organ, but its ultrastructure was unknown until recently (for review, see Tardy & Dongard, 1993). In *Ruditapes philippinarum* Tardy & Dongard (1993) described it as a central unit considered to have a mechanoreceptor and perhaps a chemoreceptor, and a peripheral unit, with unknown function. The hypothesis of a photoreceptive function has not been considered.

Ockelmann (1965) studied the relationship between egg size and prodissococonch I shell length in Mytilidae. He found that species with larger eggs also had larger prodissococonch I shells. In

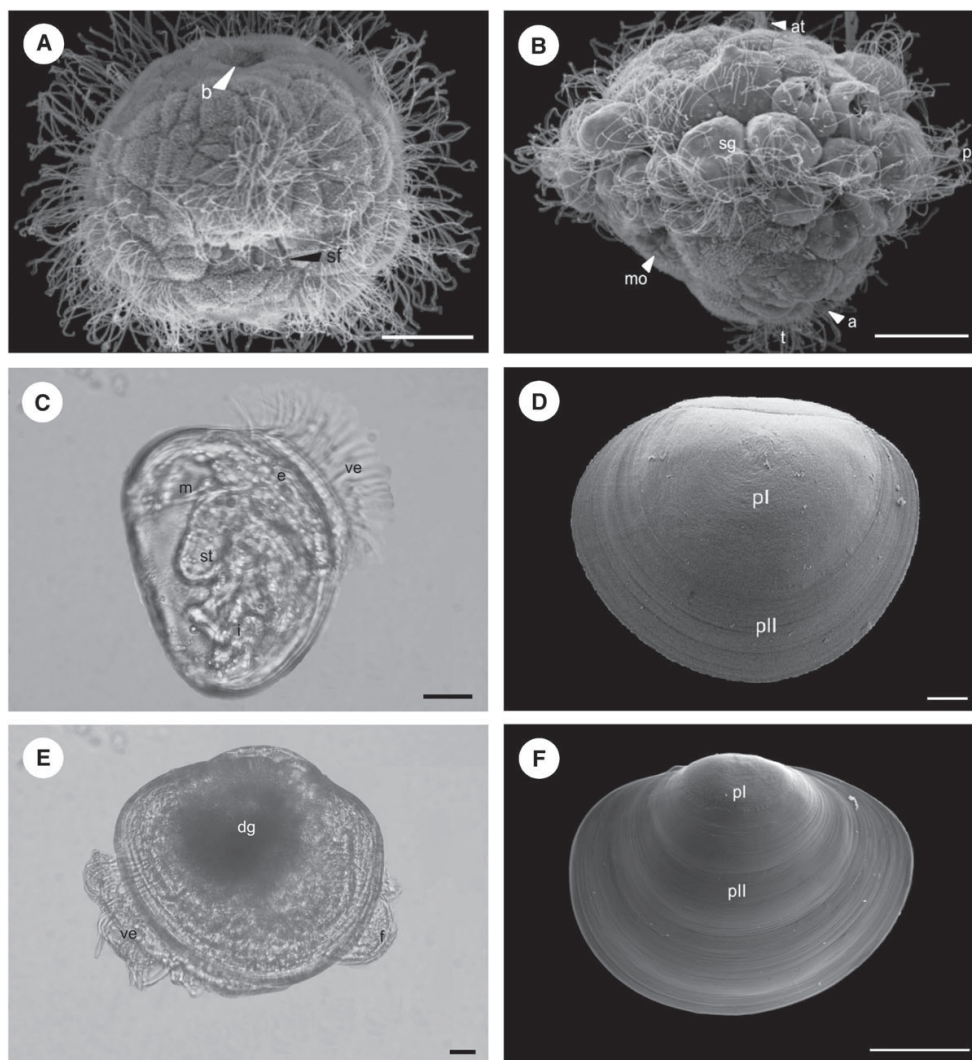
LARVAL DEVELOPMENT OF *ENSIS*

Figure 2. Development of *Ensis arcuatus*. **C, E.** Light micrographs. **A, B, D, F.** Scanning electron micrographs. **A.** Late gastrula, showing blastopore and shell field ($T_0 + 16$ h). **B.** Trochophore; shell gland is growing; mouth, anus, prototroch, telotroch and apical tuft are present ($T_0 + 19$ h). **C.** Early D-shaped larva. **D.** Lateral view of 5-day-old larva seen by cryofocusing, showing fully calcified prodissococonch I and prodissococonch II. **E.** Umbonate larva. **F.** Lateral view of post-larva. Abbreviations: a, anus; at, apical tuft; b, blastopore; dg, digestive gland; e, oesophagus; i, intestine; m, velum retractor muscle; mo, mouth; pl, prodissococonch I; pll, prodissococonch II; pr, prototroch; sf, shell field; sg, shell gland; st, stomach; t, telotroch; Ve, velum. Scale bars = 20 μm .

the Pectinidae, species such as *Chlamys hastata* or *C. islandica* with egg sizes similar to those found in *E. arcuatus* (70 μm) have D-shaped larvae of different lengths, 105 and 120 μm , respectively (Gruffydd, 1976; Hodgson & Burke, 1988), while in *E. arcuatus* it measured 110 μm (present study). In *E. directus* the oocyte diameter range was 64–73 μm , and the prodissococonch I shell measured only 80–92 μm (Loosanoff & Davis, 1963; Loosanoff *et al.*, 1966) while *S. patula* eggs measured 90 μm and D-shaped larvae had a length of 110 μm (Breese & Robinson, 1981).

Metamorphosis in *E. arcuatus* took place on Day 20 at a length of 378.81 ± 37.08 μm , while in *E. siliqua* it occurred on Day 19 at a similar size (Martínez, 2002). Breese & Robinson (1981) reported for *S. patula* cultured at $16.5 \pm 1.5^\circ\text{C}$ that the larval period lasted 20 days and length of newly settled post-larvae was 300 μm .

Ensis arcuatus has a relatively short larval life and good larval survival rate. Moreover, a new method has been developed to induce spawning, which could be a useful tool. The next step

in developing the aquaculture potential of *E. arcuatus* should be to compare growth rates under various conditions.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by Junta Asesora Nacional de Cultivos Marinos (JACUMAR) and Interreg IIIB project SHARE-90. We are grateful to the staff of Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo-CIMA (Xunta de Galicia). We also thank the CACTI-University of Vigo for their helpful assistance in sample preparation for SEM.

REFERENCES

- ANDRÉ, C., LINDERGARTH, M., JONSSON, P.R. & SUNDBERG, P. 1999. Species identification of bivalve larvae using random amplified polymorphic DNA (RAPD): differentiation between *Cerastoderma edule* and *C. lamarki*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **79**: 563–565.
- ANSELL, A.D. 1961. Reproduction, growth and mortality of *Venus striatula* (Da Costa) in Kames Bay, Millport. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **41**: 419–443.
- ALATALO, P., BERG, C.J. & D'ASARO, C.N. 1984. Reproduction and development of the lucinid clam *Codakia orbicularis* (Linné, 1758). *Bulletin of Marine Science*, **34**: 424–434.
- BELLOLIO, G., LOHRMANN, K. & DUPRÉ, E. 1993. Larval morphology of the scallop *Argopecten purpuratus* as revealed by scanning electron microscopy. *Veliger*, **36**: 332–342.
- BELLOLIO, G., TOLEDO, P. & DUPRÉ, E. 1996. Desarrollo larvario de *Choromytilus chorus* en condiciones de laboratorio. *Scientia Marina*, **60**: 353–360.
- BENNINGER, P.G., DWIONO, S.A.P. & LE PENNEC, M. 1994. Early development of the gill and its implications for feeding in *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). *Marine Biology*, **119**: 405–412.
- BREESE, W.P. & ROBINSON, A. 1981. Razor clams, *Siliqua patula* (Dixon): gonadal development, induced spawning and larval rearing. *Aquaculture*, **22**: 27–33.
- CASSE, N., DEVAUCHELLE, N. & LE PENNEC, M. 1998. Embryonic shell formation in the scallop *Pecten maximus* (Linnaeus). *Veliger*, **41**: 133–141.
- CARRIKER, M.R. 1967. Ecology of estuarine benthic invertebrates: a perspective. *Publication of the American Association for the Advancement of Science*, **83**: 442–487.
- CHANLEY, P. & ANDREWS, J.D. 1971. Aids for identification of bivalve larvae of Virginia. *Malacologia*, **11**: 45–119.
- CHAPARRO, O.R., THOMPSON, R.J. & EMERSON, C.J. 1999. The velar ciliate in the brooded larva of the Chilean oyster *Ostrea chilensis* (Philippi, 1845). *Biological Bulletin*, **197**: 104–111.
- COSTELLO, D.P. & HENLEY, C. 1971. *Methods for obtaining and handling marine eggs and embryos*. Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA.
- CRAGG, S.M. 1985. The adductor and retractor muscles of veliger of *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). *Journal of Molluscan Studies*, **51**: 276–283.
- CRAGG, S.M. 1989. The ciliated rim of the velum of larvae of *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). *Journal of Molluscan Studies*, **55**: 492–508.
- DARRIBA, S., SAN JUAN, F. & GUERRA, A. 2004. Reproductive cycle of the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in northwest Spain and its relation to environmental conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **311**: 101–115.
- D'ASARO, C.N. 1967. The morphology of the larval and postlarval *Chione cancellata* Linné (Eulamellibranchia Veneridae) reared in the laboratory. *Bulletin of Marine Science*, **17**: 949–972.
- ELSTON, R. 1980. Functional anatomy, histology and ultrastructure of the soft tissues of the larval American oyster *Crassostrea virginica*. *Proceedings of the National Shellfish Association*, **70**: 65–93.
- EYSTER, L.S. & MORSE, M.P. 1984. Early shell formation during molluscan embryogenesis with new studies on the surf clam *Spisula solidissima*. *American Zoologist*, **24**: 871–882.
- FRENKIEL, L. & MOUËZA, M. 1979. Développement larvaire de deux Tellinaceae, *Scrobicularia plana* (Semelidae) et *Donax vittatus* (Donacidae). *Marine Biology*, **55**: 187–195.
- FULLER, C.S. & LUTZ, R.A. 1989. Shell morphology of larval and post-larval mytilids from the north-western Atlantic. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **69**: 231–239.
- GOODSELL, J.G., FULLER, S.C., EVERSOLE, A.G., CASTAGNE, M. & LUTZ, R.A. 1992. Larval and early postlarval shell morphology of several venerid clams. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **72**: 231–255.
- GRIBBEN, P.E. & HAY, B.E. 2003. Larval development of the New Zealand geoduck *Panopea zelandica* (Bivalvia: Hiatellidae). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **37**: 231–239.
- GROS, O., FRENKIEL, L. & MOUËZA, M. 1997. Embryonic, larval and post-larval development in the symbiotic clam, *Codakia orbicularis* (Bivalvia: Lucinidae). *Invertebrate Biology*, **116**: 86–101.
- GRUFFYDD, L.D. 1976. The development of the larva of *Chlamys islandica* in the plankton and its salinity tolerance in the laboratory (Lamellibranchia, Pectinidae). *Astarte*, **8**: 61–67.
- GUSTAFSON, R.G. & LUTZ, R.A. 1992. Larval and early post-larval development of the protobranch bivalve *Solemya velum* (Mollusca: Bivalvia). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **72**: 383–402.
- HANYU, K., TOYAMA, K., KIMURA, T. & SEKIGUCHI, H. 2001. Larval and post-larval shell morphology of the green mussel *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) (Bivalvia, Mytilidae). *American Malacological Bulletin*, **16**: 171–177.
- HARE, M.P., PALUMBI, S.R. & BUTMAN, C.A. 2000. Single-step species identification of bivalve larvae using multiplex polymerase chain reaction. *Marine Biology*, **137**: 953–961.
- HAYWARD, P.J. & RYLAND, J.S. 1998. *Handbook of the marine fauna of North-West Europe*. Oxford University Press, Oxford.
- HODGSON, C.A. & BURKE, R.D. 1988. Development and larval morphology of the spiny scallop, *Chlamys hastata*. *Biological Bulletin*, **174**: 303–318.
- HU, Y.-P., FULLER, C., CASTAGNA, M., VRIJENHOEK, R.C. & LUTZ, R. 1993. Shell morphology and identification of early life history stages of congeneric species of *Crassostrea* and *Ostrea*. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **73**: 471–496.
- KNIPRATH, E. 1980. Larval development of the shell and shell gland in *Mytilus* (Bivalvia). *Wilhelm Roux's Archive in Developmental Biology*, **188**: 201–204.
- LE PENNEC, M. 1980. The larval and post-larval hinge of some families of bivalve molluscs. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, **60**: 601–612.
- LE PENNEC, M. & COATANE, D. 1985. Production en éclosion de l'huître océanienne *Saccostrea cucullata echinata* (Quoy et Gaimard, 1835); recherches sur la morphogénèse de la charnière. *Cahiers de Biologie Marine*, **26**: 201–206.
- LOOSANOFF, V. & DAVIES, H.C. 1950. Conditioning *Venus mercenaria* for spawning in winter and breeding its larvae in the laboratory. *Biological Bulletin*, **98**: 60–65.
- LOOSANOFF, V. & DAVIES, H.C. 1963. Rearing of bivalve larvae. *Advances in Marine Biology*, **1**: 1–136.
- LOOSANOFF, V., DAVIES, H.C. & CHANLEY, P.E. 1966. Dimensions and shapes of larvae of some marine bivalve mollusks. *Malacologia*, **4**: 351–435.
- LORENZO, S., FUENTES, J. & GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A. 2003. Identification of *Mytilus galloprovincialis* larvae from the Galician rías by mouse monoclonal antibodies. *Aquaculture*, **219**: 545–559.
- LORENZO, S., GONZÁLEZ-FERNÁNDEZ, A., DE MIGUEL, E. & FUENTES, J. 2005. Two monoclonal antibodies for the recognition of *Mytilus* spp. larvae: studies on cultured larvae and tests on plankton samples. *Aquaculture*, **250**: 736–747.
- MARTÍNEZ, D. 2002. *Estudio de los Solénidos, Solen marginatus* (Pennant, 1777) y *Ensis siliqua* (Linné, 1758), de los bancos naturales de la Ría de Ortigueira y Ría del Barquero: ciclo gametogénico, composición bioquímica y

LARVAL DEVELOPMENT OF *ENSIS*

- cultivo larvario*. PhD thesis, University of Santiago de Compostela, Spain.
- MOUÉZA, M., GROS, O. & FRENKIEL, L. 1999. Embryonic, larval and postlarval development of the tropical clam, *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia, Veneridae). *Journal of Molluscan Studies*, **65**: 73–88.
- MOUÉZA, M., GROS, O. & FRENKIEL, L. 2006. Embryonic development and shell differentiation in *Chione cancellata* (Bivalvia, Veneridae): an ultrastructural analysis. *Invertebrate Biology*, **125**: 21–33.
- OCKELMANN, K.W. 1965. Developmental types in marine bivalves and their distribution along the Atlantic coasts of Europe. *Proceedings of the First European Malacological Congress, London*, 25–53.
- REDFEARN, P., CHANLEY, P. & CHANLEY, M. 1986. Larval shell development of four species of New Zealand mussels: (Bivalvia, Mytilacea). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, **20**: 157–172.
- STEPHENSON, R.L. & CHANLEY, P.E. 1979. Larval development of the cockle *Chione stutchburyi* (Bivalvia Veneride) reared in laboratory. *New Zealand Journal of Zoology*, **6**: 553–560.
- TARDY, J. & DONGARD, S. 1993. Le complexe apical de la véligère de *Ruditapes philipinarum* (Adams et Reeve, 1850) Mollusque Bivalve Vénéridé. *Comptes Rendus de l'Académie de Sciences, Paris Serie III*, **316**: 177–184.
- VERDONK, N.H. & VAN DEN BIGGELAAR, J.A.M. 1983. Early development and the formation of germ layers. In: *The Mollusca* (K.M. Wilbur, ed.), Vol. 3. *Development* (N.H. Verdonk, J.A.M. van den Biggelaar, A.S. Tompa, eds), 91–134. Academic Press, New York.

ARTICLE IN PRESS

AQUA-628508; No of Pages 8

Aquaculture xxx (2008) xxx–xxx



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-onlineCulture potential of the razor clam *Solen marginatus* (Pennánt, 1777)Fiz da Costa^{*}, Dorotea Martínez-Patiño¹

Centro de Investigacións Mariñas, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Xunta de Galicia, 27700 Ribadeo, Lugo, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 June 2008

Received in revised form 3 November 2008

Accepted 3 November 2008

Available online xxxxx

Keywords:

Solen marginatus

Larval rearing

Spat production

Ongrowing

ABSTRACT

The objective of this study was to determine whether *Solen marginatus* could be cultured to commercial size. Fertilized eggs measured 156.2 µm in diameter and they were surrounded by a 30-µm-thick chorionic envelope. Settlement occurred on day 9 when a length of 302.6 µm was reached. The percentage of settlement varied between 28.2 and 80.9%. Growth of post-set razor clam spats was described by the equation $L = 0.006x^{1.644}$, where L =length in mm and x is the number of days of culture. The razor clam seed reached a length of 19.1 mm at 4 months. One-year-old juveniles measured 38.5 mm and commercial size was reached with three-year-old individuals (80.1 mm). Survival in the ongrowing experiment ranged between 50 and 83%. The life cycle of this species was closed, obtaining larvae from the individuals reared in the ongrowing experiment.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Solen marginatus (Pennánt, 1777) is the most abundant species of Solenidae in Spain. *S. marginatus* lives buried in sand and/or muddy sand in low intertidal and subtidal areas, from Norway to the Mediterranean and Black Sea, and West Africa (Hayward and Ryland, 1998).

In Europe, the commercial value of razor clams (*Ensis* spp. and *Solen* spp.) has increased at the same time as the fishing pressure (Darriba, 2006). Rapid expansion of the fisheries of this species has been observed as a result of improvements in handling and transport, coupled with the development of markets in Japan adding to the traditional demand in Spain (Tuck et al., 2000). Instead of their low world landings, they reach high prices in international markets (Barón et al., 2004).

The high fishing pressure could start to show signs of over-exploitation on natural beds (Gaspar et al., 1998; Tuck et al., 2000; Fahy and Gaffney, 2001), however, market demands continue to increase (Darriba, 2006). Hence, this species is of interest to aquaculture for two reasons: for food production and to improve natural stocks.

There are few studies on razor clam spawning methods (Loosanoff and Davies, 1963; Breese and Robinson, 1981; da Costa et al., 2008) and larval culture (Loosanoff and Davies, 1963; Costello and Henley, 1971; Breese and Robinson, 1981; Kenchington et al., 1998; Darriba,

2001; Martínez, 2002; da Costa et al., 2008). With later stages of culture, such as nursery (Breese and Robinson, 1981; Kenchington et al., 1998; Darriba, 2001) and ongrowing (Darriba, 2001), the number of studies is reduced.

Some notable technological advances have been made in the production of razor clams using hatchery and semi-intensive aquaculture techniques. In the Chinese provinces of Fujian and Zhejiang, for example, semi-intensive aquaculture of the razor clam *Sinovacula constricta* based on natural spatfall produces average harvests of 30 t per hectare (Nie, 1991). Seed of the Atlantic jack knife clam (*Ensis directus*) was successfully produced in the laboratory in the 1960s (Loosanoff and Davies, 1963) and the potential for its cultivation has been supported by more recent studies on its larval and juvenile development (Kenchington et al., 1998). In Europe, razor clams have been identified as good candidates for aquaculture (Darriba et al., 2002).

However, research and development on European razor clam production has been scarce. The difficulty in developing culture techniques for *S. marginatus* is due to their specific biological characteristics. A short period of natural spawning causes a limited number of larval batches to be obtained. The aquaculture development of razor clams is further impeded by their requirement for a substrate to allow burrowing (hence preventing shell gaping). Broodstocks had to be held with substrate, thus reducing the space in the hatchery and preventing convenient broodstock maintenance. Further research is essential for the development of efficient large scale hatchery production techniques for these razor clam species. Many factors must be considered when rearing *Solen* seed for ongrowing culture; these include: seed holding systems and survival times in the absence of a burrowing substrate. The study of razor clam seed growth within natural beds is hindered due to vertical migration of juveniles

^{*} Corresponding author. Tel.: +34 982128100; fax: +34 982130391.

E-mail address: fizdacosta37@gmail.com (F. da Costa).

¹ Tel.: +34 982128100; fax: +34 982130391.

within the sediments. Therefore, it is imperative to develop holding systems that facilitate the study of growth and survival.

In the present study we show the results of the first investigations on the culture of the razor clam *S. marginatus* from spawning to commercial size. These investigations will allow identifying the constraints of razor clam hatchery culture, thus permitting future research based on these results.

2. Materials and methods

2.1. Broodstock collection and maintenance

A hundred individuals measuring 103.9 ± 9.4 mm in length (surpassing commercial size established at 80 mm) were collected by "salting method" from a natural bed in an intertidal area of Redondela, in Ría de Vigo (Galicia, NW Spain). In the salting method, salt is spread on the beach and in the area of burrowing entrances of the razor clams. The animals then, due to their sensitivity to salt, leave the burrow gallery and are easily collected from the sand.

At Centro de Cultivos de Ribadeo-CIMA, 50 razor clams were disposed in each of the two 200-L rectangular fiberglass tanks. Individuals were cultured at 19 ± 1 °C with mild aeration in open circuit with 18 L per hour of sand-filtered seawater flow. The individuals were fed daily with a mixed culture of *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros calcitrans*, *Phaeodactylum tricornutum* and *Skeletonema costatum* in equal proportions at a ration of 6% mean dry meat weight of adults per day. After sampling, male:female proportion was established at 1:1 ratio. Broodstocks were held for one week, and after they were induced to spawn.

2.2. Spawning induction

Groups of 25 individuals selected at random from the conditioning tanks were exposed to different stimuli: 1. thermal shock, with temperatures up to $25\text{--}27$ °C maintained during 1 h, decreasing down to $10\text{--}12$ °C for 30 min. A total of 3–4 cycles were performed. Additional stimulation was provided by adding gametes stripped from one of the conditioned bivalves and microalgae; 2. changing water level by simulating tides, with brief dry periods as described in da Costa et al. (2008). The method consisted in leaving individuals for 30 min in emersion, and then for one hour in seawater at ambient temperature (15 ± 1 °C). Thereafter, 3–4 cycles of each treatment were repeated; 3. stripping gonads of the conditioned razor clams; and 4. UV-treated seawater flow. Individuals were placed into 200-L rectangular tanks without any substratum and held in row bars tied individually with rubber bands in open circuit. The specimens responding to the stimulus were separated into individual 1-L test tubes for the release of sperm or eggs, thus, avoiding self-fertilization. A mixture of sperm from 3–4 males was used for fertilization in a ratio of 2 mL of sperm per liter of egg suspension (Helm et al., 2004). Fertilization was conducted in a 5-L flask. After fertilization, the eggs were sieved through a $45\text{ }\mu\text{m}$ screen to eliminate excess sperm.

2.3. Larval rearing

Then, the embryos were transferred to 500-L larval culture tanks per duplicate with aerated water at 19 ± 1 °C. Water was changed every two days using $1\text{ }\mu\text{m}$ sand-filtered, UV-sterilized seawater. Egg density in each container at the beginning of the experiment was 5 eggs/mL. D-stage veliger larvae were fed daily with *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri* and *C. calcitrans* in equal proportions at 40 cells/ μL as initial ration. Six different larval batches per duplicate were studied during the juvenile production for on-growing experiments. Another five larval batches per duplicate were cultured from spawning obtained with broodstocks from on-growing experiment. Larvae were collected from each tank through Nytex screens and shell length was measured

for 100 individuals using a Nikon Laborphot-2 microscope connected to the image analyzer PC Image.

2.4. Spat production

Postlarvae were cultured in sieves in 500-L larval rearing tanks each of which had an inverted air supply. Every postlarval batch was split into two tanks as replicates. Three different postlarval batches were studied during juvenile production for the on-growing experiment. Another five postlarval batches were cultured from spawnings obtained with broodstocks from on-growing experience. Water was changed 3 times a week and temperature was set to 19 ± 1 °C. Feeding was prepared with equal proportions of *P. lutheri*, *I. galbana*, *T. suecica* and *C. calcitrans* in equal proportions at an initial daily ration of 80 cells/ μL . When the seeds reached 1 mm in length, the razor clams were provided with sand for burrowing. Postlarval shell length from each tank was determined for 50 individuals weekly using a Nikon SMZ-10A stereozoom microscope connected to the image analyzer PC Image. When spat reached an adequate length they were measured with a digital caliper.

When spats reached 10 mm in length, they were transferred to 200-L rectangular tanks in open circuit with a 10 cm layer of sand at the bottom. The seeds were fed with a mixed diet of *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans*, *P. tricornutum* and *S. costatum* at the same proportion at a ration between 2 and 3% mean dry meat weight of the individuals per day. Samples for measuring seeds were taken weekly. Razor clams were measured using a digital caliper and weighed individually on a GRAM Precision ST 3100 (s.d.=0.01 g) balance.

2.5. On-growing experience

When spats from the spawning of 12th May 2004 reached a length of 19.10 ± 1.92 mm (4 months old), they were transferred to natural beds. The seeds were placed in containers in an intertidal bed of Ría de Ribadeo (Galicia, NW Spain). Individuals were transferred to $50\text{ cm} \times 50\text{ cm} \times 50\text{ cm}$ mesh cages with a stainless steel frame, each of which was fitted with a top cover with a 2 mm mesh net to prevent razor clam migration. These cages were buried in the sand leaving approximately 5 cm of each cage protruding above the surface of the sediments. Density in the cages was 400 individuals per square meter. This density was chosen to guarantee a statistically significant sample during the study until commercial size was reached. Individuals were disposed in 6 containers. Consecutively, with monthly low tides, one cage was sampled burrowing to empty out the substratum and to recover all the individuals. The rest of the cages were cleaned and predators were eliminated. The following month the next cage was sampled repeating the procedure. Every month the top covers of the cages were replaced due to fouling. At this time all the razor clams collected in each cage were counted, measured and weighed so that estimates of growth and survival could be made. The number of individuals sampled varied between samplings/cages, but it was always between 50–100 individuals. The measurements were made in situ using a digital caliper and weighed individually on a Scaltec SAS-62 (s.d.=0.1 g) portable balance. At the end of each sampling session, the individual razor clams were returned to their corresponding cages.

Temperature and salinity were recorded daily at a location close to the cages using a portable conductivity meter WTW LF197. Chlorophyll a concentration in the water column was recorded weekly by INTECMAR (Instituto Tecnológico do Medio Mariño-Xunta de Galicia) at a location close to the cages in Ría de Ribadeo. Chlorophyll a concentration was determined by spectrofluorometric methods.

Once individuals reached commercial size (80 mm), they were used as broodstocks in the hatchery facilities to obtain spawning, as described before to close the culture cycle. An improvement in

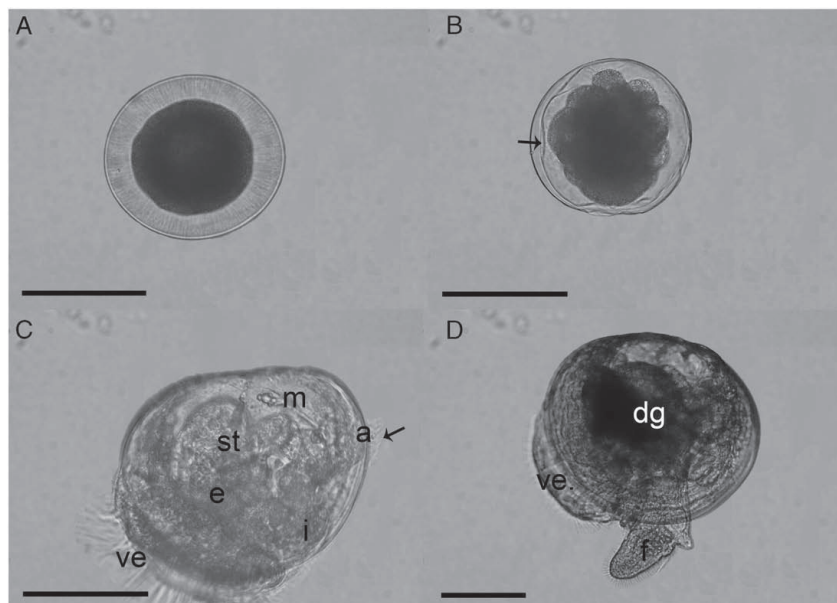


Fig. 1. Larval development of *S. marginatus*: (A) fertilized egg; (B) 16-cell stage, showing chorionic envelope and lipid droplet (arrow); (C) D-shaped larvae. a, anus; e, esophagus; i, intestine; m, muscle; st, stomach; ve, vellum; arrow, post-anal tuft; (D) pediveliger. dg, digestive gland; f, foot; ve, vellum. Scale bar: 100 μ m.

nursery culture protocol was introduced, eliminating the use of substratum during this culture phase.

3. Results

3.1. Spawning induction

Adult individuals of *S. marginatus* were spawned in the hatchery from April until June. Neither changing water levels, stripping gonads, nor UV-treated seawater flow were effective as spawning methods. Only after thermal shock when returned to tanks, spawning occurred the next day.

3.2. Larval rearing

Unfertilized eggs of *S. marginatus* were brown, spherical with a mean diameter of 156.2 ± 14.6 μ m and were surrounded by a 30- μ m-thick chorionic envelope (Fig. 1A). Embryonic development can be followed inside the chorionic envelope. Inside this chorionic membrane a lipid droplet was observed as a granular liquid (Fig. 1B). This lipid droplet was depleted as the number of cells in embryonic development increased, disappearing completely when the gastrula stage was reached. Gastrula was still inside the chorionic envelope and faster trochophore stage was reached. Trochophores rotate actively inside the envelope due to ciliary movement, allowing the trochophore to swim in the water column. In *S.*

marginatus the coat surrounding the eggs was shed at the beginning of the development of straight-hinged larvae.

Typical straight-hinged D-shaped larvae developed from a trochophore by 24 hpf and these were 167.4 ± 9.3 μ m long (Fig. 1C and Table 1). At this time "D" larvae have a developed digestive system, consisting of a mouth, a foregut, a digestive gland followed by an intestine and an anus. The post-anal tuft of a few simple cilia was dorsal to the anus. The mantle cavity was evident at this stage of development.

Three-day-old larvae, which become oval in shape, were slightly umbonate, with a length of 204.2 ± 6.7 μ m. Six days after fertilization, they reached the pediveliger stage, with a size of 242.0 ± 20.29 μ m, crawling and swimming for short intervals, with the vellum still functional (Fig. 1D). During metamorphosis the vellum can be shed completely as one unit or it can be deciliated gradually before being histolyzed, and gill development begins. Nine-day-old larvae settled when a size of 302.6 ± 17.7 μ m was reached. Larval survival ranged between 28 and 81%, with an average of 53% (Table 2).

The relationship between shell length and height of the larvae was linear (Fig. 2) and described by the following equation,

$$\log H = 0.911L + 0.124$$

where L and H are length and height (μ m) of the larvae, respectively, and a determination coefficient (r^2) of 0.941 ($p < 0.05$).

Table 1
Different larval stages in *S. marginatus*

| Time post-fertilization | Stage | Length (μ m) (mean \pm s.d.) |
|-------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| 12–24 h | Trochophore | 156.2 ± 14.6 |
| 1 day | D-shaped larvae | 167.4 ± 9.3 |
| 3 days | Umbonate larva | 204.2 ± 6.7 |
| 5 days | Pediveliger | 242.0 ± 20.29 |
| 8–9 days | Post-larva | 302.6 ± 17.7 |

Table 2
Details of larval culture in *S. marginatus*

| Date of spawning | Number of eggs (in millions) | Percentage of settlement (%) |
|------------------|------------------------------|------------------------------|
| 28 May 2003 | 0.66 | 56.99 |
| 18 June 2003 | 1.12 | 80.87 |
| 20 June 2003 | 0.56 | 47.04 |
| 28 June 2003 | 5.65 | 28.24 |
| 12 May 2004 | 3.27 | 43.97 |
| 30 June 2004 | 1.69 | 62.36 |

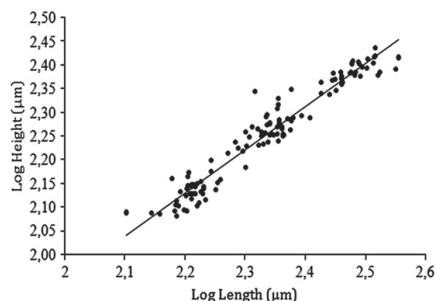


Fig. 2. The relationship between length and height of the larvae of *S. marginatus*.

3.3. Spat production

Nine-day-old postlarvae measured $303.9 \pm 22.7 \mu\text{m}$, while 1-month-olds reached $2135.9 \pm 520.7 \mu\text{m}$ in length (Fig. 3A). In this phase the shape of the razor shell becomes apparent. Mortality is very high from 15-day-old postlarvae to day 22 of culture, coinciding with one millimeter of length. Survival of 1-month-old spats was 8.6%. Two-month-old spats measured 6–7 mm in length, reaching 15–16 mm after 90 days of culture (Fig. 3B). The growth of post-set razor clams can be described by the equation

$$Y = 0.006x^{1.644}$$

where Y = length in mm and x is the number of days of culture (Fig. 4).

Seed weight was 0.03–0.04 g per individual after 60 days of culture, increasing to 0.13 g at day 90.

3.4. Ongrowing experience

Initial length was $19.10 \pm 1.93 \text{ mm}$ (4-month-old juveniles), corresponding to $0.24 \pm 0.08 \text{ g}$ of fresh weight (Fig. 5). Six-month-old seeds measured $31.55 \pm 3.58 \text{ mm}$. Elevated growth was observed until November, coinciding with high seawater temperatures and algal bloom in October–November. From November onwards, no growth was present. From April onwards, significant growth was observed. One-year-old juveniles (May 2005) reached $38.53 \pm 3.89 \text{ mm}$, corresponding to a weight of $1.56 \pm 0.46 \text{ g}$. Survival during the first year of ongrowing was up to 80%. Two-year-old juveniles reached $67.13 \pm 5.14 \text{ mm}$ in length, with a survival of 62%. Commercial size was reached with three-year-old individuals ($80.06 \pm 5.17 \text{ mm}$). The growth period lasted from March–April until September–October. From the end of autumn until late winter no growth was observed. Survival in the ongrowing experiment ranged between 50 and 83%.

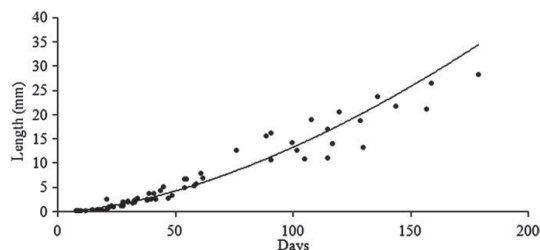


Fig. 4. Growth of post-set *S. marginatus*. The curve obtained by fitting the growth equation is indicated.

Length-weight relationship was made by adjustment of an exponential curve

$$W = 0.00003L^{2.956}$$

where W is weight in g and L is length in mm (Fig. 6).

Fig. 7 shows the temperature and salinity variation pattern in the water column during the 3-year study. Temperature ranged between 8.5 and 21.8 °C during this period. From October onwards, temperatures gradually declined until the advent of winter. Minimum temperatures (8.5 °C) were recorded between January and mid-March. From April onwards, temperatures increased until mid-July and remained stable until October. Recorded salinity presented an average of 31.9, with low values as low as 15.2, corresponding to floods during autumn and winter. The rest of the year salinity was around 32–35.

Fig. 8 shows the variation pattern of the concentration of chlorophyll *a* in the water column during the 3-year study. The highest values were found in March–April and September–October, 3.2 and 8.9 $\mu\text{g/L}$, respectively. During winter the concentrations of chlorophyll *a* were very low.

The life cycle of this species was closed, obtaining larvae from the individuals reared in the ongrowing experiment. Seven spawnings were obtained from broodstock reared in the hatchery and four of them were studied (Table 3). The maximum number of eggs released was 2.5 million from one spontaneous spawning, from 42 broodstocks. The highest survival in the settlement was 83%, with an average of 48%. From settlement to 30 days of culture, the highest survival was 46%, with an average survival in this phase of 35%.

4. Discussion

The lack of efficient artificial stimuli to induce spawning still hinders the controlled development of several bivalve species

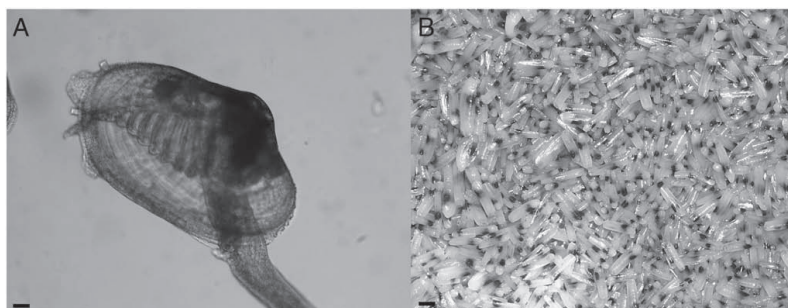


Fig. 3. (A) One-month-old postlarvae and (B) juveniles. Scale bar: (A) 100 μm ; (B) 1 mm.

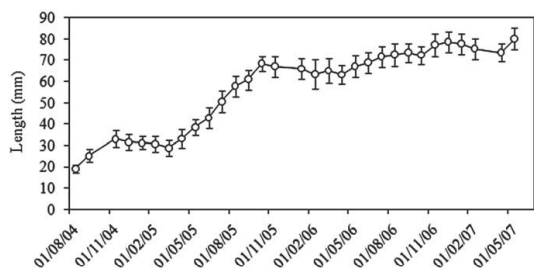


Fig. 5. Growth in length of juveniles on-grown in cages.

(Mouëza et al., 1999). Temperature fluctuation successfully induced spawning in some venerid clams (for review, see Stephenson and Chanley, 1979), but it was not efficient for most species, even in the same family (D'Asaro, 1967). In other razor clam species, such as *Siliqua patula*, the methods developed for other mollusks were not effective (Breese and Robinson, 1981). They generated normal larvae, stripping gonads and with high microalgal concentration of *Pseudoisochrysis paradoxa*. Loosanoff and Davies (1963) in *E. directus* found that by increasing the temperature from 13 to 25 °C males would spawn and continue to release sperm even after they were cooled to 13 °C. The success of fertilizing eggs stripped from conditioned females depended on the degree of their ripeness (Loosanoff and Davies, 1963). Early in the season, when the largest egg was only 66 µm, none were fertilizable. Later, when the razor clams were riper, a large percentage of stripped eggs underwent cleavage, but most of the larvae were abnormal. In *Siliqua patula* Breese and Robinson (1981) using the stripping method yielded 6 to 35% straight-hinged larvae. But in *S. marginatus* no fertilization was obtained by stripping gonads. In *Ensis arcuatus* changing water levels by simulating tides, with brief dry periods, caused spawning (da Costa et al., 2008). Martínez-Patiño et al. (2007) reported spawning induction in *E. siliqua* with thermal shock, increasing from 10 °C up to 25 °C. In *E. macha* thermal shock was also successful, increasing temperature from 11 °C to 17–18 °C in 2 or 3 cycles of 30 min each (Lépez et al., 2008). Although there are several effective spawning methods in different razor clam species, in the spawning experiments conducted, the broodstock of *S. marginatus* failed to spawn when subjected to the different stimuli. Only after thermal shock when returned to tanks, spawning occurred the next day.

The oocyte of *S. marginatus* is surrounded by a 30-µm-thick and 150-µm-diameter egg capsule. In *S. marginatus* the thick chorion must have a fluid membrane to allow trochophores to swim inside and also a lipid droplet to provide energy for embryonic development. Carriker (1967) suggested that the presence of this jelly coat is an adaptation to

fluctuating estuarine environments. This brood protection is an adaptation to osmotic pressure changes and pollution in the environment in *Scrobicularia plana* (Frenkiel and Mouëza, 1979). The size of this oocyte is very large compared to other razor clams eggs. The oocyte size of *E. arcuatus* is approximately 75 µm in diameter (da Costa et al., 2008), similar to that found for other razor clam species, such as *E. directus* (Loosanoff and Davies, 1963; Loosanoff et al., 1966) and *E. siliqua* (Martínez, 2002).

Metamorphosis in *S. marginatus* took place after 8–9 days of culture, with a length of 302.6 ± 17.7 µm. In *E. arcuatus* it took place at day 20, with a length of 378.81 ± 37.08 µm (da Costa et al., 2008), while in *E. siliqua* it occurred on day 19 with a similar size (Martínez, 2002). Breese and Robinson (1981) reported for *Siliqua patula* cultured at 16.5 ± 1.5 °C that the larval period lasted 20 days and newly settled postlarval length was 300 µm. Pre-metamorphic larval stage in *E. macha* was reached after 15–20 days of culture with a length of 290 µm (Lépez et al., 2008). Kenchington et al. (1998) obtained *E. directus* pediveliger larvae in 15–16 days, with a size of 245×206 µm. Compared with other razor clam species *S. marginatus* has a faster larval development, which can reduce the appearance of problems during this phase, thus, increasing larval survival. This difference can be related to egg size, and the elevated amount of energy reserves stored in the oocyte, such as proteins and lipids, especially neutral lipids (da Costa et al., 2007). This species also has a high larval survival rate (53%), compared to other razor clam species, such as *E. arcuatus* (25%) and *E. siliqua* (40%) (da Costa et al., 2006; Martínez-Patiño et al., 2007). Breese and Robinson (1981) for *S. patula* only reported a considerable mortality during metamorphosis, identifying this process as a major barrier to efficient culture of razor clams. The use of proper substrate material may reduce mortality at metamorphosis. The high larval survival in *S. marginatus* may allow obtaining enough larvae ready for settlement, thus not limiting seed production.

After one month of culture *S. marginatus* reached 2.1 mm, doubling the size of *E. arcuatus* and *E. siliqua* seeds (Darriba, 2001; da Costa, 2006). Although *S. marginatus* postlarvae settled at a smaller size, they had more days from settlement until one month, coinciding with the time when the spat became razor shaped. A faster development in this critical phase may reduce mortality in the nursery. Four-month-old *S. marginatus* juveniles reached 19 mm in length, while *E. arcuatus* and *E. siliqua* reached around 30 mm (Darriba, 2001; da Costa, 2006). Kenchington et al. (1998) reported a size of 7–9 mm in 3-month-old *E. directus* juveniles and Lépez et al. (2008) cited 10 mm in length at the same time for *E. macha*. *S. marginatus* seed culture is feasible, however, there are still problems to solve. The culture of the razor clam is constrained by the fact that they need to be buried and that they are sensitive to manipulation (Darriba et al., 2002). More research is needed to determine what size should be reached for culture without substrate.

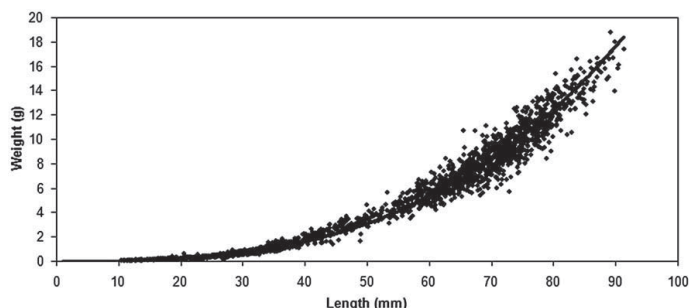


Fig. 6. The relationship between length and weight of the juveniles on-grown in cages.

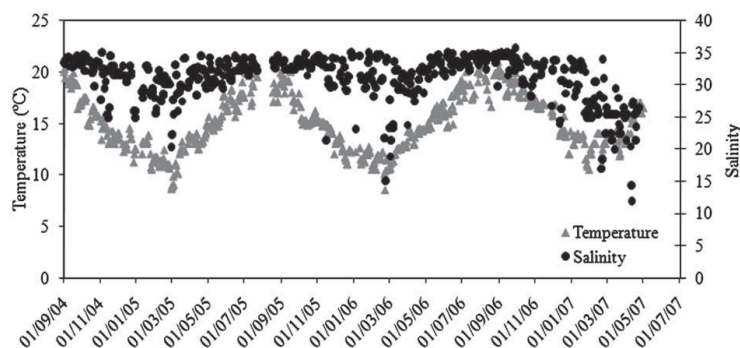


Fig. 7. Temperature and salinity variation pattern in the water column.

Postlarval and seed survival was quite low, being around 5–10% after 30 days and 2–5% after 90 days from settlement. There was drastic mortality when 1 mm in length was reached. From this size onwards survival was constant. In the present study different modifications were introduced in the postlarval culture protocols from the beginning until larvae were obtained with broodstock from on-growing experience. The results of postlarval survival, closing the *S. marginatus* life cycle, were significantly higher (35%) compared to previous results, thus reducing the drastic mortality found in early investigations when postlarvae reached 1 mm in length. An experiment with *S. marginatus*, using 1.3 mm seed length and testing the effect of substrate on the seed culture of this species, revealed that successful postlarval culture can be undertaken (da Costa, unpublished data). Three different treatments were used in this trial: containers without substrate and containers with two types of sand. A higher survival was observed in razor clam seed cultured without substrate (81.9%), compared to 36.1 and 53.3% for the other two treatments. Different changes in handling and culture protocols may allow in future years to improve spat culture yields.

In our study *S. marginatus* seed reached 38 mm in length after 1 year of culture, from 4 months reared in a natural bed. Darriba (2001) studying *E. arcuatus* growth reached 64 mm with individuals held in a nursery, with a higher temperature and food ration than the values found in the bay. After 2 years *S. marginatus* reached 78 mm, close to the commercial size (80 mm). Three-year-old razor clams reached commercial size. In *E. arcuatus* after 2 years length ranged between 90–100 mm. The growth pattern is similar to the one presented by Maia et al. (2006a) using annual surface growth rings and acetate peel technique, finding similar lengths to those found in

our study. Robinson and Richardson (1998) with acetate peel technique in *E. arcuatus* cited 40 mm and 80 mm in length, during the first year and second years of life, respectively. Gaspar et al. (1994), also applying the same technique, reported 80 mm in length in one-year-old juveniles, while using annual surface growth rings they obtained a length of 55 mm.

After 6 months of culturing in cages *E. arcuatus* juveniles obtained from natural beds survival was 68.5% and after 12 months 56.8% (Darriba, 2001). With *S. marginatus* juveniles reared in hatchery we found better survival rates, 81% and 71%, respectively.

In *S. marginatus* a seasonal growth pattern was observed, with length and weight increments from March–April until September–October. During the end of autumn and winter no growth was observed. Maia et al. (2006a) found a similar pattern in Ría de Aveiro (northern Portugal).

The influence of environmental conditions on bivalve growth has been mentioned by several authors, with the most important parameters being temperature and food (reviewed in Bayne and Newell, 1983). But other parameters such as salinity are also important, affecting energy budget and growth of estuarine bivalves (Kautsky, 1982; Shumway, 1982). This is why we have considered temperature, salinity and chlorophyll a concentration. The latter was considered to be an indicator of the amount of phytoplankton (food) that is present (Lalli and Parsons, 1997). The growth season begins when water temperature starts to increase. The growth pattern is clearly related with higher concentrations of chlorophyll a in water column. However, the high values of this pigment present in October coincide with the beginning of the no-growth season. Temperature and chlorophyll a (amount of food) had a combined effect. During

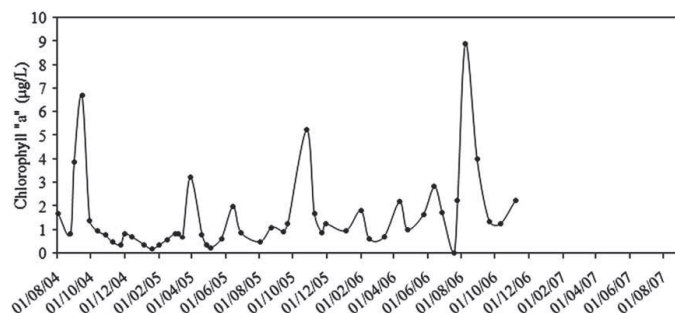


Fig. 8. Chlorophyll a concentration in the water column.

Table 3

Larval and postlarval culture from broodstock reared in the hatchery (spawning of 12 May 2004)

| Date of spawning | Number of eggs (in millions) | Percentage of settlement (%) | Percentage from settlement to 30 days (%) |
|------------------|------------------------------|------------------------------|---|
| 26 May 2007 | 2.16 | 82.8 | 45.6 |
| 1 June 2007 | 1.89 | 33.3 | 33.9 |
| 13 June 2007 | 2.50 | 41.1 | 35.0 |
| 15 June 2007 | 1.00 | – | – |
| 27 June 2007 | 1.50 | 36.6 | 23.5 |

March–April temperature begins to rise coinciding with a chlorophyll a maximum, and with other pigment maximum during the summer.

Salinity may not affect growth in *S. marginatus*. This razor clam is usually found in the internal part of estuaries, hence, in locations where individuals are exposed to drastic salinity variations. During most of the experiment, practical salinity ranged between 25 and 30. Salinity drops were short-term variations. Few of the salinity decreases coincided with growth periods, hence, the effect of salinity on growth may be limited. However, most of the salinity drops were found during winter, when no growth was observed. During the no-growth season the interaction between the different environmental factors cannot be determined, neither can the one that had a greater effect.

Gametogenic production may have affected growth since year 1 due to first gonad maturity (personal observation). A reduction in growth rate was observed at year 2 and this could be related to a higher gametogenic activity. Reallocation of energy from somatic growth to gametogenic production occurs in bivalves, and could be the final determinate of growth rate in mature bivalves (Bayne and Newell, 1983). First maturity in *S. marginatus* occurs at a length of 44.7 mm in males and 47.7 mm in females (Maia et al., 2006b). These values correspond to one year length, only the bigger individuals maturing the first year of life. A small energy contribution is needed this year, allowing a high growth rate during summer. From second maturity onwards growth rate decreases, due to a higher energy destination to gametogenesis.

During a few months of the study a small decrease in mean length of the juveniles ongrown in cages was observed. Spatial distribution of the containers can affect growth of the different replicates. Although cages were buried at the same tidal elevation, and so time of emersion may affect in a similar way all the cages, this distribution may interact with the water currents. A constraint in water flow in some of the cages would reduce the amount of food available, thus affecting growth.

Another factor affecting juvenile growth can be the intertidal location of the containers. Higher growth can be exhibited in subtidal locations due to a more constant availability of food. Also, an intertidal location will be exposed to periods of emersion and different environmental factor such as salinity decrease during rains or temperature increase during summer. More investigation should be addressed to determine the effect of site selection in this species. But the difficulty of sampling of burrowed containers in subtidal areas still hinders the development of subtidal on-growing cultures.

5. Conclusion

S. marginatus has a short larval life and good larval survival rate. Postlarvae and seed showed good growth rates, although survival was quite low. The culture of seed is constrained by the fact that they need to be buried. Ongrowing of *S. marginatus* showed adequate survival rates and took three years to reach commercial size. Closing the life cycle allowed to include this species as an aquaculture potential species. So, the next step in developing the aquaculture potential of *S. marginatus* should be to compare growth rates under various conditions.

Acknowledgements

We are grateful to the staff of Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo-CIMA (Xunta de Galicia). Fiz da Costa González was partly supported by a Xunta de Galicia fellowship. This research was funded by the Junta Asesora Nacional de Cultivos Marinos (JACUMAR) and Interreg IIIB projects, SHARE-90 and TIMES. We would like to thank INTECMAR (Instituto Tecnológico do Medio Mariño-Xunta de Galicia) for providing chlorophyll a data and J. López and C. López of Centro de Experimentación Pesquera CEP-Castropol for their assistance in some of the cage samplings.

References

- Barón, P.J., Real, L.E., Ciocco, N.F., Ré, M.E., 2004. Morphometry, growth and reproduction of an Atlantic population of the razor clam *Ensis macha* (Molina, 1782). *Sci. Mar.* 68 (2), 211–217.
- Bayne, B.L., Newell, R.C., 1983. Physiological energetic of marine molluscs. In: Saleuddin, A.S.M., Wilbur, K.M. (Eds.), *The Mollusca: physiology*, vol. 4 (1). Academic Press, New York, pp. 407–415.
- Breese, W.P., Robinson, A., 1981. Razor clams, *Siliqua patula* (Dixon): gonadal development, induced spawning and larval rearing. *Aquaculture*. 22 (1–2), 27–33.
- Carriker, M.R., 1967. Ecology of estuarine benthic invertebrates: a perspective. *Publ. Am. Assoc. Adv. Sci.* 83, 442–487.
- Costello, D.P., Henley, C., 1971. Methods for obtaining and handling marine eggs and embryos. *Mar. Biol. Lab. Woods Hole, MA*.
- da Costa, F., 2006. Culture of three commercial razor clam species in Galicia (NW Spain). *Abstracts Aquaculture Europe 2006*. Firenze, Italy, 9–13 May.
- da Costa, F., Nóvoa, S., Martínez, D., 2006. Effects of temperature upon larval culture in the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865). *Abstracts Aquaculture Europe 2006*. Firenze, Italy, 9–13 May.
- da Costa, F., Martínez-Patiño, D., Nóvoa, S., Ojea, J., 2007. Crecimiento y viabilidad larvaria en relación a la composición bioquímica y de ácidos grasos en los ovocitos de 3 especies de solénidos: *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865), *Ensis siliqua* (Linné, 1758) y *Solen marginatus* (Pennant, 1777). XI Congreso Nacional de Acuicultura. Vigo, Spain, 24–28 September.
- da Costa, F., Darriba, S., Martínez-Patiño, D., 2008. Embryonic and larval development of *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) (Bivalvia: Pharidae). *J. Molluscan Stud.* 74, 103–109.
- Darriba, S., 2001. Biología de la navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865) de la Ría de Vigo (N.O. de España): crecimiento y reproducción. Ph. D. thesis. University of Vigo, Spain.
- Darriba, S., 2006. Razor clams and aquaculture: studies in Galicia (NW of Spain). *Abstracts Aquaculture Europe 2006*. Firenze, Italy, 9–13 May.
- Darriba, S., Martínez, D., Guerra, A., 2002. The razor clam *Ensis arcuatus*: perspectives for hatchery outgrowing culture. *Abstracts Aquaculture Europe 2002*. Special publication n° 32, pp. 198–199.
- D'Asaro, C.N., 1967. The morphology of the larval and postlarval *Chione cancellata* Linné (Eulamellibranchia Veneridae) reared in the laboratory. *Bull. Mar. Sci.* 17, 949–972.
- Fahy, E., Gaffney, J., 2001. Growth statistics of an exploited razor clam (*Ensis siliqua*) bed at Gormanstown, Co Meath, Ireland. *Hydrobiologia* 465, 139–151.
- Frenkiel, L., Mouëza, M., 1979. Larval development of two Tellinaceae, *Scrobicularia plana* (Semelidae) and *Donax vittatus* (Donacidae). *Mar. Biol.* 55, 187–195.
- Gaspar, M.B., Richardson, C.A., Monteiro, C.C., 1994. The effects of dredging on shell formation in the razor clam *Ensis siliqua* from Barrinha, Southern Portugal. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 74 (4), 927–938.
- Gaspar, M.B., Castro, M., Monteiro, C.C., 1998. The influence of tow duration and tooth length on the number of damaged razor clams, *Ensis siliqua*. *Mar. Ecol., Prog. Ser.* 169, 303–305.
- Hayward, P.J., Ryland, J.S., 1998. *Handbook of the marine fauna of North-West Europe*. Oxford Univ. Press, Oxford.
- Helm, M.M., Bourne, N., Novatelli, A., 2004. Hatchery culture of bivalves. A practical manual. *FAO Fish. Tech. Paper*. No. 471. Rome, Italy, 177 p.
- Kautsky, N., 1982. Growth and size structure in Baltic *Mytilus edulis* populations. *Mar. Biol.* 68, 117–133.
- Kennington, E., Duggan, R., Riddell, T., 1998. Early life history characteristics of the razor clam (*Ensis directus*) and the moonshells (*Euspira* spp.) with applications to fisheries and aquaculture. *Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.* 2223 vii + 32p.
- Lalli, C.M., Parsons, T.R., 1997. *Biological Oceanography. An introduction*, 2nd ed. The Open University, Great Britain.
- López, I., Vélaz, F.E., Arriagada, D., 2008. Cultivo de la navaja (*Ensis macha*) en Chile. In: Guerra, A., Lodeiros, C. (Eds.), *Navajas y longueirões: biología, pesquerías y cultivo*. Xunta de Galicia, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos, Santiago de Compostela, Spain, pp. 213–221.
- Loosanoff, V., Davies, H.C., 1963. Rearing of bivalve larvae. *Adv. Mar. Biol.* 1, 1–136.
- Loosanoff, V., Davies, H.C., Chanley, P.E., 1966. Dimensions and shapes of larvae of some marine bivalve mollusks. *Malacologia* 4, 351–435.
- Maia, F., Sobral, M.P., Gaspar, M., 2006a. Ciclo reproductivo e primeira maturação de *Solen marginatus* e *Venerupis pullastra* na Ría de Aveiro. *Relat. Cient. Téc. IPIMAR, Série digital*, vol. 30, 35 pp. <http://ipimar-iniap.ipimar.pt>.
- Maia, F., Sobral, M.P., Gaspar, M., Pimenta, J., 2006b. Estudo do crescimento de *Solen marginatus* e de *Venerupis pullastra* na Ría de Aveiro. *Bases científicas para a gestão de estes recursos*. *Relat. Cient. Téc. IPIMAR, Série digital*, vol. 34, 40 pp. <http://ipimar-iniap.ipimar.pt>.

- Martínez, D., 2002. Estudio de los Solénidos, *Solen marginatus* (Pennánt, 1777) y *Ensis siliqua* (Linné, 1758), de los bancos naturales de la Ría de Ortigueira y Ría del Barquero: ciclo gametogénico, composición bioquímica y cultivo larvario. Ph. D. thesis. University of Santiago de Compostela, Spain.
- Martínez-Patiño, D., da Costa, F., Cromie, A., Nóvoa, S., Ojea, J., Werner, A., Browne, L., Fernández-Tajes, J., Méndez, J., Gaspar, M., Constantino, R., Roberts, D., McDonough, N., 2007. Desarrollo de la acuicultura de navajas y longueirones: cultivo en criadero. Actas del XI Congreso Nacional de Acuicultura, Vigo, Spain, 24–28 September.
- Mouéza, M., Gros, O., Frenkiel, L., 1999. Embryonic, larval and postlarval development of the tropical clam, *Anomalocardia brasiliiana* (Bivalvia, Veneridae). J. Moll. Stud. 65, 73–88.
- Nie, Z.Q., 1991. The culture of marine bivalve molluscs in China. In: Menzel, W. (Ed.), Estuarine and marine bivalve mollusk culture. CRC Press, Boca Ratón, Florida, pp. 261–276.
- Robinson, R.F., Richardson, C.A., 1998. The direct and indirect effects of suction dredging on a razor clam (*Ensis arcuatus*) population. ICES J. Mar. Sci. 55, 970–977.
- Shumway, S.E., 1982. Oxygen consumption in oysters: an overview. Mar. Biol. Lett. 3, 1–23.
- Stephenson, R.L., Chanley, P.E., 1979. Larval development of the cockle *Chione stutchburyi* (Bivalvia Veneride) reared in laboratory. New Zealand J. Zool. 6 (4), 553–560.
- Tuck, I.D., Bailey, N., Harding, M., Sangster, G., Howell, T., Graham, N., Breen, M., 2000. The impact of water jet dredging for razor clams, *Ensis* spp., in a shallow sandy subtidal environment. J. Sea Res. 43 (1), 65–81.

Navajas y longueirones: biología, pesquerías y cultivo

Editores: Alejandro Guerra Díaz y César Lodeiros Seijo

Edita y publica:

Xunta de Galicia, Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos

Editores:

Alejandro Guerra Díaz y Cesar Lodeiros Seijo

Fotografías de portada:

J. L. Lorenzo y J. Molares Vila.

Diseño de portadas:

Jorge Rodríguez Castro y Rosa Martín

Diseño y maquetación:

Rosa M^a Martín y Jorge Rodríguez Castro

Imprime:

Litonor

Dep. Legal: C 206-2008

ISBN: 978-84-453-4546-7

Copyright de textos: los autores de cada capítulo del libro

Capítulo 8: Cultivo de navaja, longueirón y longueirón vello

Dorotea Martínez Patiño y Fiz da Costa González

Resumen

En este capítulo se analiza el cultivo integral de los solénidos *Ensis arcuatus*, *Ensis siliqua* y *Solen marginatus*. El cultivo de estas especies se inicia con el acondicionamiento de adultos, para su utilización como reproductores; en las experiencias realizadas se consiguió adelantar y ampliar el período de puesta dos meses. En las mismas condiciones de cultivo, cada especie presenta una duración del período larvario diferente, siendo el más corto el de *S. marginatus*, seguida de *E. siliqua* y *E. arcuatus*, con una duración de 8, 14 y 20 días, respectivamente. La semilla obtenida de las dos especies de *Ensis*, necesitó sustrato para su mantenimiento a partir del mes de vida y *S. marginatus*, que es la que presenta mayor supervivencia en todas las fases de cultivo, se pudo mantener sin él. La semilla al alcanzar el tamaño adecuado, es trasladada al medio natural adaptándose con alta supervivencia a las condiciones de los bancos naturales donde se asientan estas especies. Se consiguió realizar el seguimiento de los juveniles de *E. arcuatus* y *S. marginatus* hasta la talla comercial.

1. Introducción

Las especies de solénidos que existen en Galicia son objeto de explotación por parte de los mariscadores; su captura está sujeta a planes de explotación elaborados por la administración en colaboración con el sector marisquero, basándose en el estado del recurso y en el conocimiento biológico de las especies. En algunos de los bancos naturales ha habido descensos de la producción, paulatinamente o de una forma brusca, pudiendo estar motivado tanto por una sobreexplotación del recurso como por descensos de los reclutamientos naturales. Para paliar este problema una medida posible es suplir este descenso de producción con la siembra de juveniles trasladados de otros bancos naturales o bien obtenidos en criadero.

En los últimos años se ha desarrollado la tecnología para el cultivo intensivo de moluscos bivalvos en instalaciones adecuadas. Las investigaciones sobre estas instalaciones criadero (hatchery) y semillero (nursery), comienzan en los años 50 y avanzan hacia la producción a escala industrial de algunas especies de bivalvos en los años 70, instalándose los primeros criaderos industriales en Galicia; a finales de esta década la administración instala un criadero en Ribadeo. En esta instalación, desde 1978, se vienen realizando cultivos larvarios, postlarvarios y de semilla, hasta una talla adecuada para su traslado al medio natural, de especies de moluscos bivalvos de interés comercial (Guerra, 1979). Los primeros trabajos

Cultivo y artes de pesca

se hicieron con ostra plana (*Ostrea edulis*) y almeja fina (*Ruditapes decussatus*) según las técnicas descritas por Loosanoff y Davis (1963) y Walne (1966). Basándose en las técnicas empleadas para estos cultivos, y con adaptaciones para cada caso, se han cultivado otras especies de bivalvos de interés comercial en Galicia como son: almeja babosa (*Venerupis pullastra*), almeja japonesa (*Ruditapes philippinarum*) y coquina (*Donax trunculus*). Desde la década de los 90 también se lleva a cabo el cultivo de las especies de Solénidos que se comercializan en Galicia: *Solen marginatus*, *Ensis siliqua* y *Ensis arcuatus* (Martínez, 2002). Aunque en esta fecha todavía no había demanda para su producción en criadero, las investigaciones se hicieron con el fin de conocer su biología y de estudiar la posibilidad de incrementar su producción en el medio natural y, en algunos casos, de asegurar la sostenibilidad del recurso. En los últimos años se produjo un descenso en la producción de los bancos naturales de *Solen marginatus*, principalmente en las Rías Altas gallegas, debido a elevadas mortalidades (Martínez, 2002), lo que supuso un descenso en los reclutamientos y en definitiva en la producción de adultos comerciales.

En otros lugares y con otras especies, el cultivo de solénidos ha comenzado a estudiarse hace tiempo. Así, en Norte América los primeros estudios se realizaron en escala de laboratorio con *Ensis directus* (Sullivan, 1948; Costello y Henley, 1971; Loosanoff y Davis, 1963), intentando en la actualidad llevarlo a escala industrial (Leavitt *et al.*, 2002, 2005). En Dinamarca también se investiga la posibilidad de cultivar la especie *E. directus*, a pesar de ser invasora (Freudentahl y Nielsen, 2005). También en Norte América a finales de los años 70 se comenzó a estudiar el cultivo de *Siliqua patula* (Breese y Robinson, 1981). En Chile a partir de los años 90 se empiezan a desarrollar estrategias de cultivo para *E. macha* como respuesta a la fuerte presión que sufre esta especie (Lépez, 2006). Un proyecto conjunto de la iniciativa europea Interreg IIIB entre C-Mar, IPIMAR, BIM, Universidad de La Coruña y CIMA denominado SHARE-90 (Sustainable HARvesting of *Ensis*) ha permitido que recientemente se cultive de forma experimental *E. arcuatus* y *E. siliqua* en Irlanda del Norte (Reino Unido).

Partiendo principalmente de las experiencias llevadas a cabo en el Centro de Cultivos Marinos de Ribadeo, se analizan los sistemas de obtención de semilla y los de engorde en el medio natural.

2. Cultivo en criadero

2.1. Acondicionamiento

Una de las fases en un criadero de moluscos es el acondicionamiento de los reproductores. Este proceso consiste en mantener los adultos en las instalaciones de cultivo en unas condiciones adecuadas para modificar el desarrollo gonadal, así en individuos que su ciclo reproductivo presenta cortos períodos de madurez se puede conseguir que las puestas sean más prolongadas en el tiempo. Esto se realiza controlando el medio físico, incidiendo en la temperatura, y la alimentación, controlando

la calidad y cantidad del fitoplancton para que con todo ello además de adelantar la madurez sexual, se consiga potenciar la fecundidad de los progenitores, mejorando la calidad de los huevos y la viabilidad larvaria, permitiendo así optimizar su cultivo.

Los solénidos presentan un ciclo anual con un periodo de madurez y puesta que según la especie oscila entre 2 y 4 meses (Tabla I).

2.1.1. Sistema

El proceso comienza con la recogida de los reproductores de talla comercial en los bancos naturales. Un traslado adecuado de los progenitores al criadero permite asegurar que lleguen en buen estado. De esta forma se puede aumentar el rendimiento de las puestas y mejorar su calidad. Estas especies son delicadas y poseen unas valvas muy alargadas que se abren en toda su longitud, viviendo en el medio natural enterradas a cierta profundidad en el sustrato. Por ello, los individuos deben mantenerse atados con gomas en haces y cubiertos por paños húmedos en agua de mar, e ir refrigerados a 10°C.

Tabla I. Época de puesta en las tres especies de solénidos en Galicia.

| | Época puesta | Localización | Autores |
|-------------------------|--------------|-------------------|--------------------------------|
| <i>Ensis arcuatus</i> | enero-mayo | Ría de Vigo | Darriba <i>et al.</i> , (2004) |
| <i>Ensis siliqua</i> | mayo-junio | Fisteria | Darriba <i>et al.</i> ,(2005) |
| <i>Ensis siliqua</i> | mayo-junio | Ría del Barquero | Martínez (2002) |
| <i>Solen marginatus</i> | mayo-junio | Ría de Ortigueira | Martínez (2002) |

Para el acondicionamiento se pueden utilizar tanques con diferentes capacidades, con entrada de agua en continuo, en el fondo se debe mantener una capa de arena de grano medio-fino de unos 30-40 cm de espesor (Figs. 1 y 2). La densidad de estabulación en tanques con arena no debe ser superior a 140-160 individuos m⁻², puesto que densidades mayores dificultan el enterramiento de los ejemplares.

Cultivo y artes de pesca

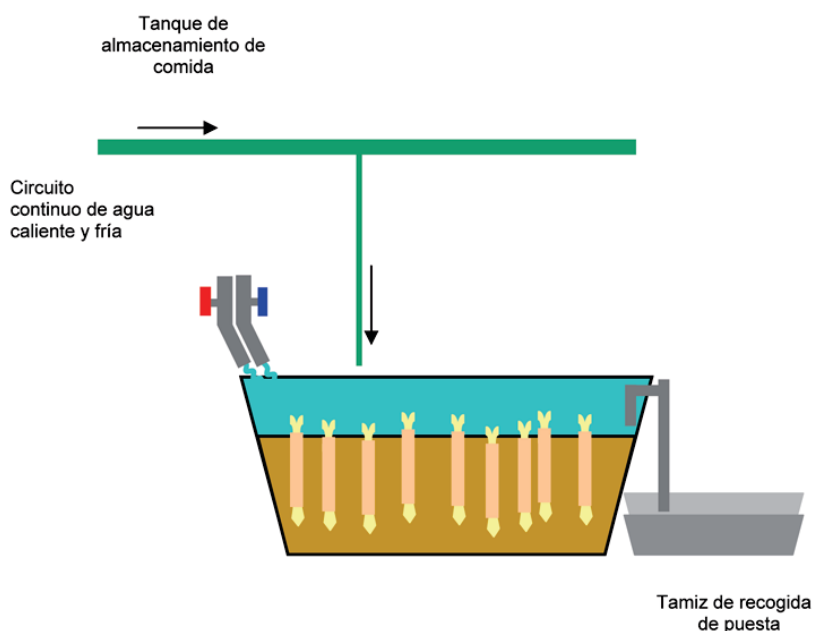


Figura 1. Esquema del mantenimiento de reproductores para su acondicionamiento.

En la estabulación de progenitores de estas especies se emplea algún tipo de sustrato, generalmente arena, imitando el medio natural para que permanezcan enterrados en ella y mantengan las valvas cerradas. El uso de la arena como sustrato presenta inconvenientes ya que su manipulación es difícil y si ocurren puestas espontáneas se pierden gran cantidad de huevos en la superficie de la arena, puesto que la tendencia de éstos es de permanecer en el fondo.

Este sistema logra supervivencias de los reproductores superiores al 90%, mostrándose adecuado para el mantenimiento de estas especies.

Por ello se ha desarrollado un método alternativo de mantenimiento de los progenitores utilizados para la inducción, atando los ejemplares individualmente a varillas de vidrio por medio de gomas, evitando que las valvas se abran, y permitiendo una adecuada movilidad de los individuos para no causarles estrés. Las pruebas de acondicionamiento sin sustrato dan como resultado mortalidades elevadas de los adultos, notables a partir de 10-15 días, con lo que no se puede realizar el acondicionamiento sin sustrato.



Figura 2. Mantenimiento de reproductores en tanques con arena.

2.1.2. Temperatura

El longueirón (*E. siliqua*) y el longueirón vello (*S. marginatus*) siguen el patrón normal de comportamiento en el acondicionamiento de bivalvos, en el que al aumentar la temperatura del agua (17-20°C) se acelera la maduración. En cambio, la navaja (*E. arcuatus*) es indiferente al aumento de la temperatura, puesto que puede madurar con la temperatura del agua del medio natural sin necesidad de que se eleve (12-15°C), posibilitando el ahorro de energía en el criadero, pues evita calentar el agua de cultivo.

2.1.3. Alimentación

Para la alimentación se utilizaron combinaciones de especies empleadas comúnmente en un criadero de moluscos. Se usaron dietas mixtas compuestas por: *Tetraselmis suecica*, *Isochrysis galbana*, *Pavlova lutheri*, *Chaetoceros calcitrans*, *Phaeodactylum tricornutum* y *Skeletonema costatum* obteniendo resultados satisfactorios. En cuanto a la ración en pruebas de acondicionamiento con el longueirón (*E. siliqua*), nuestras experiencias sugieren que la mejor ración es el 6% en peso seco. Suministrando raciones de 3 y 9% se consigue también promover el desarrollo gonadal.

2.1.4. Estadío inicial

Realizando experiencias de acondicionamiento en las 3 especies en diferentes épocas del año y partiendo de diferentes estadios del desarrollo gonadal, los resultados muestran que desde el estadio de reposo se puede llegar a la madurez sexual, pero no se adelanta significativamente la maduración respecto a la del medio natural. Lo más adecuado es comenzar el acondicionamiento desde el estadio de "inicio de la gametogénesis", consiguiendo así adelantar las puestas aproximadamente 2 meses.

2.1.5. Calidad de las puestas

Las puestas de los reproductores recogidos del medio natural en madurez comparadas con las producidas con el acondicionamiento en *S. marginatus* no presentan diferencias en la calidad, ni en el desarrollo larvario, postlarvario y de semilla, medido en términos de crecimiento y supervivencia. Si se comparan el crecimiento y supervivencia de diferentes puestas procedentes de individuos acondicionados y del medio natural no se encuentra un comportamiento significativamente distinto entre ambos grupos.

2.2. Inducción a la puesta

Un aspecto que puede limitar la producción de larvas de moluscos bivalvos en criadero es la inexistencia de métodos de inducción a la puesta adecuados. Este procedimiento consiste en inducir a los bivalvos maduros a liberar sus gametos en respuesta a un estímulo que se les aplica, con lo que en un criadero se pueden obtener puestas, siempre que los individuos presenten gametos maduros. Esto permite planificar los cultivos, además de realizar una fecundación controlada. Con fines de investigación es importante, puesto que permite controlar un mayor número de parámetros del cultivo.

En la bibliografía existen diversos métodos de inducción para bivalvos: el choque térmico adicionando gametos y microalgas, métodos químicos como el empleo de la serotonina (Madrones-Ladja, 1997) o el peróxido de hidrógeno; o métodos fotoquímicos como el flujo de agua pasada por ultravioleta, sin alimento; o concentraciones elevadas de alimento como la experiencia realizada por Breese y Robinson (1981) con *Siliqua patula*.

Para intentar producir el menor nivel de estrés, los ejemplares se dispusieron individualmente atados con gomas en varillas de vidrio y fueron sometidos a diferentes estímulos físicos (Fig. 3a).

En *E. arcuatus* el estímulo efectivo que promueve la puesta es el cambio de niveles de agua a 15°C, con breves períodos de desecación, simulando el efecto de las mareas. Después de 2 horas desde el inicio de la inducción comienzan a desovar los ejemplares. (Fig. 3b). La falta de respuesta en la navaja al elevar la temperatura del agua es coincidente con su comportamiento en el medio natural, puesto que la emisión de gametos se produce entre enero y abril, cuando la temperatura del agua es fría.

Por el contrario, *E. siliqua* desova con el choque térmico de 10 °C hasta 25 °C, con adición de microalgas y gametos masculinos. Esto puede deberse a que las puestas en el medio natural se producen a finales de la primavera, con el consiguiente aumento de la temperatura del agua.

Con el longueirón vello (*S. marginatus*) se realizaron numerosas pruebas con diferentes estímulos para la inducción a la puesta. Tras la estimulación por choque térmico se suele obtener una puesta al día siguiente en el mismo tanque que se realiza la inducción.

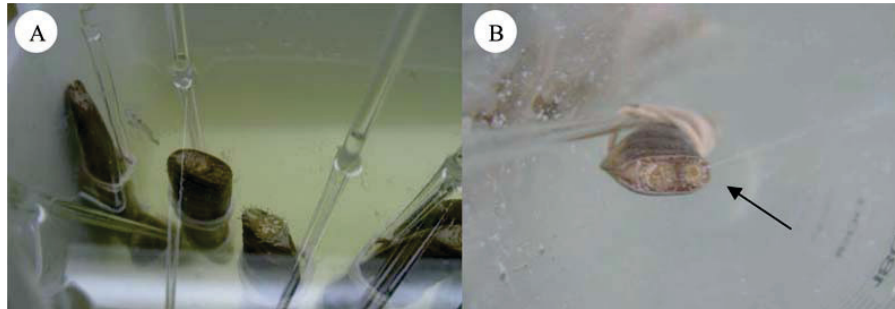


Figura 3. (A) Sistema de mantenimiento de reproductores colgados en varillas de vidrio. **(B)** Hembra de *E. arcuatus* desovando tras la inducción.

2. 3. Embriología y desarrollo larvario

2.3.1. Desarrollo embrionario

En la producción de bivalvos, el éxito de los cultivos depende sobre todo de la superación de dos etapas cruciales en el desarrollo larvario, la embriogénesis y la metamorfosis.

Una vez que los reproductores liberaron los gametos masculinos y femeninos se hace una fecundación controlada. Para ello se induce en un tanque a un grupo de individuos y a medida que comienza la emisión de gametos se separan en recipientes individuales. Los ovocitos de las hembras se juntan en un recipiente y se fertilizan con el esperma de varios machos. Para evitar en la medida de lo posible la poliespermia, el exceso de espermatozoides se elimina filtrando posteriormente los ovocitos por un tamiz de 45 μm . A continuación, se transfieren a jarras graduadas para su conteo y se transvasan a tanques de cultivo larvario con aireación débil y sin alimentación hasta alcanzar la larva D veliger.

Los ovocitos de navaja (*E. arcuatus*) son los más pequeños de las tres especies (75 μm) (Fig. 4), mientras los de longueirón (*E. siliqua*) tienen un diámetro de 90-100 μm y los de longueirón vello (*S. marginatus*) una talla de 130-140 μm (Tabla II). El ovocito de *S. marginatus* presenta una envuelta coriónica de unos 20-30 μm de espesor.

En *E. arcuatus* la fase de trocófora se alcanza a las 19 horas post-fertilización (hpf) y aparece la larva D veliger a las 30 hpf. El desarrollo embrionario en el longueirón es más rápido, llegando en 12 y 24 horas a trocófora y larva D veliger,

Tabla II. Comparativa del desarrollo embrionario entre especies. Hpf: 1ª horas post-fertilización.

| | Talla ovocito | 2 células | Trocófora | Larva D veliger |
|-------------------------|---------------|-----------|-----------|-----------------|
| <i>Ensis arcuatus</i> | 75 µm | 1 hpf | 19 hpf | 30 hpf |
| <i>Ensis siliqua</i> | 90-100 µm | 1 hpf | 12 hpf | 24 hpf |
| <i>Solen marginatus</i> | 130-140 µm | - | - | 12- 24 hpf |

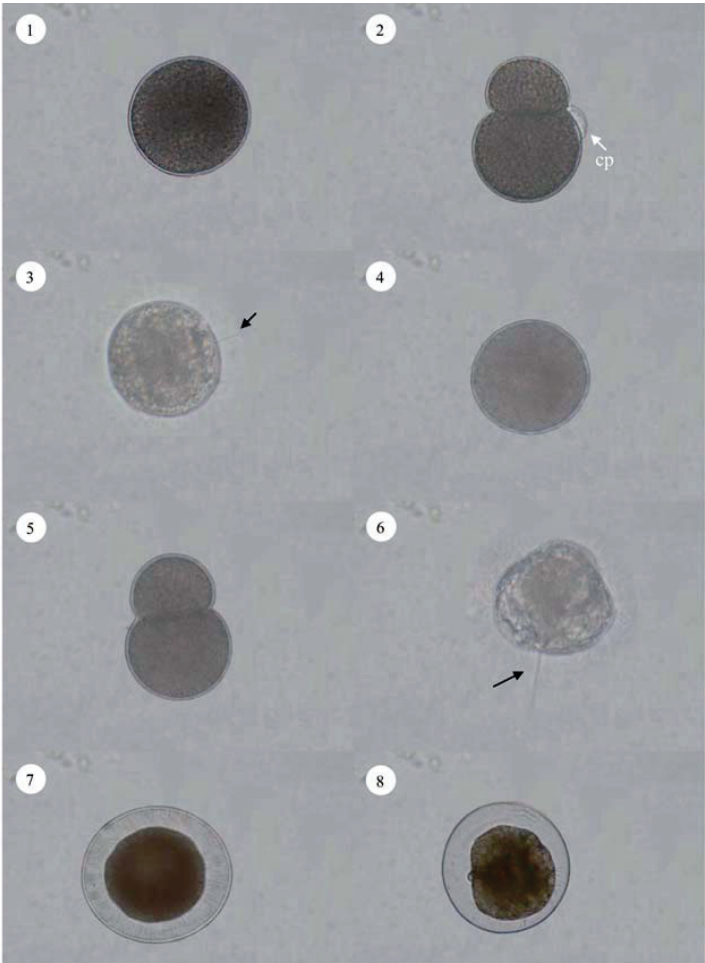


Figura. 4. (1) Ovocito de *E. arcuatus*. (2) Estadio de 2 células en *E. arcuatus*. c. p.: corpúsculo polar. (3) Trocófora en *E. arcuatus*. Penacho apical (flecha). (4) Ovocito de *E. siliqua*. (5) Estadio de 2 células en *E. siliqua*. (6) Trocófora en *E. siliqua*. Penacho apical (flecha). (7) Ovocito de *S. marginatus*. (8) Trocófora con envoltura coriónica en *S. marginatus*.

respectivamente (Figs. 4 y 5). *S. marginatus* alcanza el estadio de larva D en menos de 24 horas tras la fecundación. Se observa que el desarrollo embrionario de *S. marginatus* tiene lugar dentro de la envuelta coriónica, incluida la trocófora que gira debido a la actividad ciliar dentro del corión, perdiendo la envuelta en la larva D veliger. En estas especies hay una relación entre el tamaño de los ovocitos y la duración del desarrollo embrionario, presentando el desarrollo larvario más largo la especie con menor tamaño de ovocitos.

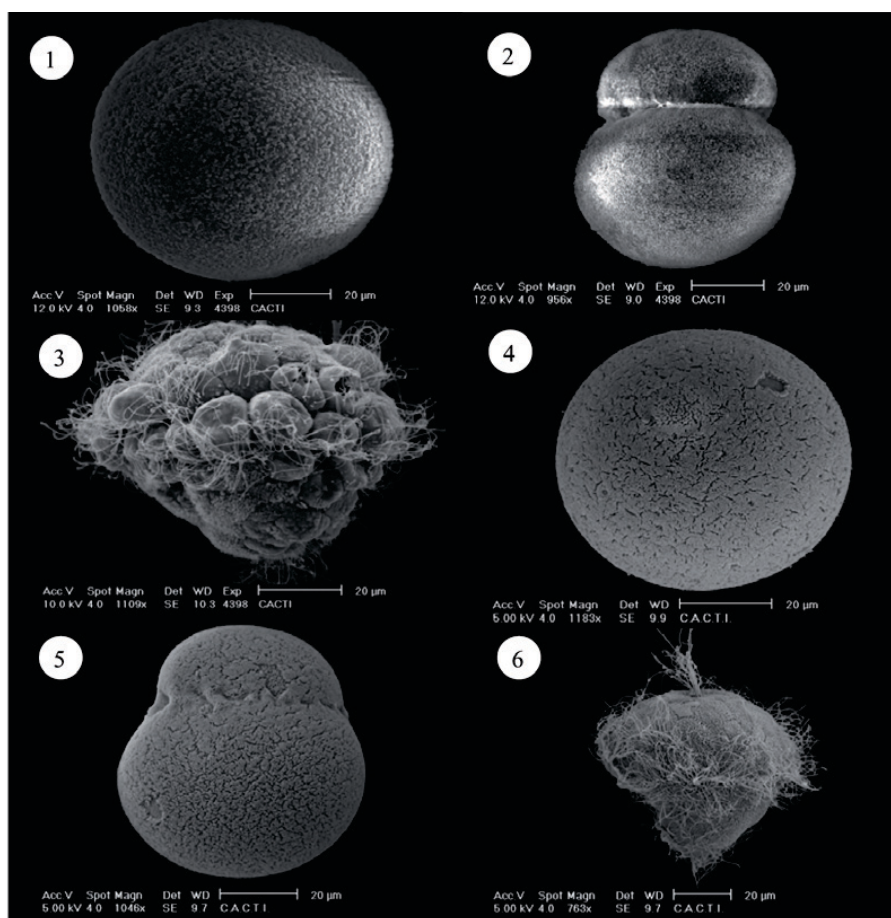


Figura 5. Microfotografías de microscopio electrónico de barrido de distintos estadios embrionarios en *Ensis*. **(1)** Ovocito de *E. arcuatus*. **(2)** Estadio de 2 células en *E. arcuatus*. **(3)** Trocófora en *E. arcuatus*. **(4)** Ovocito de *E. siliqua*. **(5)** Estadio de 2 células en *E. siliqua*. **(6)** Trocófora en *E. siliqua*

2.3.2. Desarrollo larvario

Las experiencias de cultivo de larvas se realizaron en tanques troncocónicos de 150 y 500 l, en los que se utiliza una densidad inicial de 5 larvas ml⁻¹, hasta 1-2 postlarvas ml⁻¹ en la metamorfosis. El cambio de agua se realizó tres veces a la semana con agua de mar filtrada por filtro de arena y esterilizada con ultravioleta a una temperatura de 19±1°C. La dieta estuvo compuesta por *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri* y *C. calcitrans* en igual proporción y el suministro fue diario. La alimentación comienza en el día 1 (larva D) con una ración de 40 células µl⁻¹, aumentándose paulatinamente hasta 80 células µl⁻¹ y variando la ración según cambia el cultivo.

La larva D veliger en *E. arcuatus* tiene una longitud de aproximadamente 120 µm (Fig. 6). La larva D posee un órgano por el cual se desplaza y captura el alimento (velo), además presenta un aparato digestivo completo: boca, esófago, estómago, intestino y ano, que está rodeado por un mechón post-anal. A partir de los 7 días post-fertilización (dpf) la larva veliger comienza a umbonarse con 170-180 µm, alcanzando el estadio de pediveliger a los 14 dpf, con talla de 280 µm. La pediveliger repta con el pie ciliado, además de capturar alimento y nadar con el velo. Poco a poco el velo se pierde o reabsorbe apareciendo los filamentos branquiales.

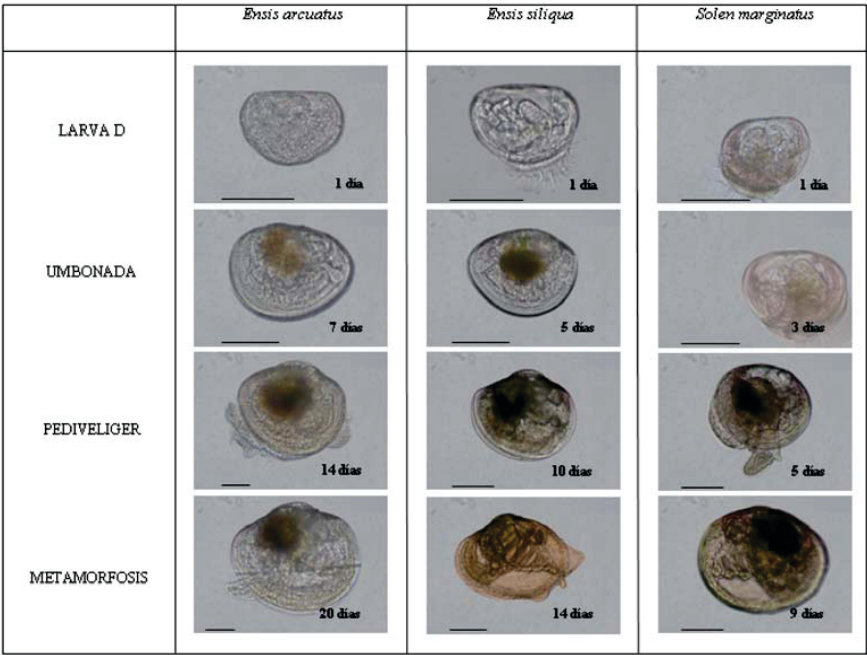


Figura 6. Resumen del desarrollo larvario en *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*. Escala=100 µm.

En *E. siliqua* las larvas D veliger tienen un tamaño similar, 120-125 μm de longitud y a los 5 días presentan umbo. Las larvas umbonadas tienen una longitud de unos 210 μm , y en ellas la glándula digestiva tiene un fuerte color marrón. Con unas 340 μm de longitud y aproximadamente 10 dpf se alcanza el estado de pediveliger, en el que la larva aún conserva el velo como órgano de captación de alimento y desplazamiento, pero ya tiene pie, con el que principalmente reptará por el sustrato.

La larva D veliger de *S. marginatus* mide aproximadamente 150-160 μm . En la larva veliger a los 3 dpf aparece el umbo, con una longitud de 200 μm y la glándula digestiva comienza a ser más evidente. Ésta, con el paso de los días adquiere más coloración, llegando a pediveliger a los 6 dpf, con una talla de 270 μm .

En condiciones similares de cultivo la duración del desarrollo larvario es diferente para cada especie. Así, el longueirón vello (*S. marginatus*) fija a una talla de 350 μm a los 8-9 días de cultivo (Tabla III), mientras la navaja (*E. arcuatus*) lo hace a los 20 días y el longueirón (*E. siliqua*) a los 14 días, en ambos casos con una talla de unas 400 μm (Fig. 7). La postlarva de *S. marginatus* fija a una talla menor debido en parte a que posee una forma más redondeada que las postlarvas de las dos especies de *Ensis*.

Tabla III. Comparativa del desarrollo larvario entre especies.

| | Talla Larva D | Umbonada | Pediveliger | Período larvario | Talla fijación |
|----------------------|-------------------|-------------------|-------------------|------------------|-------------------|
| <i>E. arcuatus</i> | 120 μm | 180 μm | 280 μm | 20 días | 400 μm |
| <i>E. siliqua</i> | 125 μm | 210 μm | 340 μm | 14 días | 400 μm |
| <i>S. marginatus</i> | 160 μm | 200 μm | 270 μm | 8 días | 350 μm |

Estas diferencias de talla en la fijación y la duración del periodo larvario repercuten en las tasas de crecimiento. La tasa de crecimiento diario en *S. marginatus* es de 16-18 $\mu\text{m día}^{-1}$, siendo superior a la de las otras dos especies, siguiendo un ajuste lineal, como en la mayoría de los bivalvos. En *E. siliqua* la tasa de crecimiento es 14-16 $\mu\text{m día}^{-1}$ y la de *E. arcuatus* es menor con 13-14 $\mu\text{m día}^{-1}$ (Fig. 7). En las Figs. 8 y 9 se muestra la relación longitud-altura y longitud-peso en las larvas de las tres especies, con un ajuste exponencial en ambos casos.

Cultivo y artes de pesca

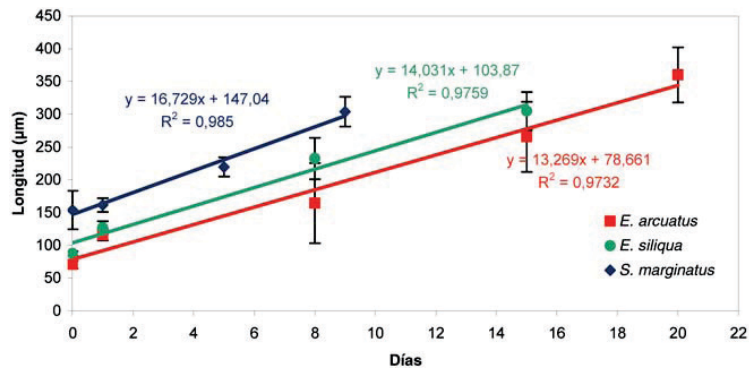


Figura 7. Crecimiento en longitud de las larvas de *E. arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*.

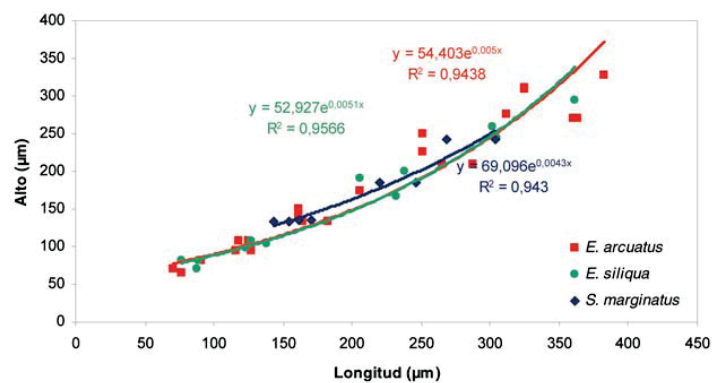


Figura 8. Relación longitud-alto en las larvas de *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *S. marginatus*.

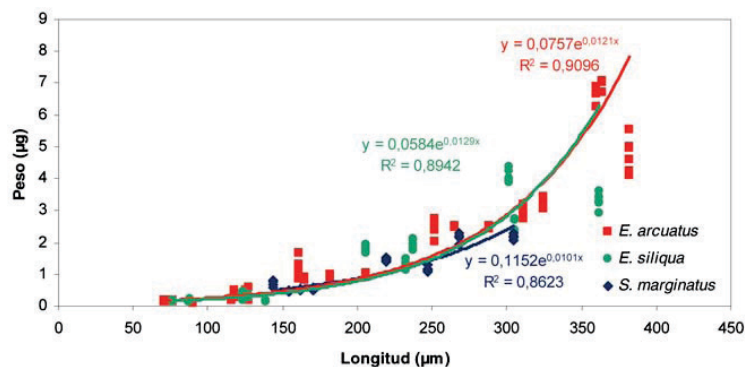


Figura 9. Relación longitud-peso en las larvas de *Ensis arcuatus*, *E. siliqua* y *Solen marginatus*.

2.3.2.1. Influencia de la temperatura en el cultivo larvario de *E. arcuatus*

Se hicieron estudios con diferentes temperaturas para determinar la temperatura óptima de cultivo en *E. arcuatus*. Las larvas D veliger se mantuvieron por duplicado en tanques de 150 l. a 14, 18 y 24 °C, con cambios de agua cada dos días con agua de mar filtrada y esterilizada con ultravioleta. La alimentación diaria consistió en una mezcla de microalgas compuesta por *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri* y *C. calcitrans* con una ración inicial de 40 células μl^{-1} .

La temperatura óptima para el cultivo larvario en la navaja (*E. arcuatus*) es de 14 °C, con una supervivencia mayor, aunque alcanzan la fijación el día 26. A 18 °C las larvas se transforman el día 20, y a 24 °C las larvas crecen a la misma tasa pero se mueren poco antes de alcanzar la fijación. Es mejor cultivar las larvas a menor temperatura debido a que logran una mayor supervivencia, aunque el periodo larvario se extienda unos días más.

2.3.2.2. Influencia de las dietas en el cultivo larvario de *E. arcuatus*

Para optimizar la alimentación de *E. arcuatus* en la fase de cultivo larvario se ensayaron distintas combinaciones de microalgas como dietas. Las dietas usadas fueron las siguientes mezclas: dieta 1: *Isochrysis galbana* y *Pavlova lutheri*; dieta 2: *I. galbana*, *P. lutheri* y *Chaetoceros calcitrans*; dieta 3: *I. galbana*, *C. calcitrans* y *Tetraselmis suecica*; dieta 4: *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans* y *T. suecica*; a una ración de 30 células μl^{-1} . La temperatura fue de 18 °C y se utilizó agua de mar filtrada y esterilizada por ultravioleta cambiándola cada dos días.

Durante el desarrollo larvario de *E. arcuatus* la dieta de mayor supervivencia larvaria (25%) es la compuesta por *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri* y *C. calcitrans*. Con el resto de dietas hay supervivencias entre el 5 y el 10%. En general las dietas multialgales muestran mejores rendimientos al conseguir satisfacer todos los requerimientos nutricionales de las larvas.

2. 4. Cultivo postlarvario y de semilla

El paso de la fase natátil larvaria a sésil (postlarva) se realiza en tanques troncocónicos de 150 litros en cilindros con malla de 150 m. El flujo es forzado por "air-lift" descendente. El cambio de agua se realiza tres veces a la semana con agua de mar filtrada y esterilizada con ultravioleta, manteniendo la temperatura a $18 \pm 1^\circ\text{C}$. De los tanques de 150 litros en circuito cerrado, la semilla se transfiere a tanques rectangulares de 1000 litros en los mismos cilindros en circuito abierto a la misma temperatura (Fig. 10). Una vez la semilla alcanza 10 mm, ésta se puede traspasar a tanques rectangulares de 200 litros, con una capa de arena de grano medio-fino en el fondo de 10 cm de espesor, donde se mantiene hasta la siembra a $18 \pm 1^\circ\text{C}$. Los tanques se mantienen en circuito abierto, con dieta de *T. suecica*, *I. galbana*, *P. lutheri*, *C. calcitrans*, *P. tricornutum* y *S. costatum* en la misma proporción.

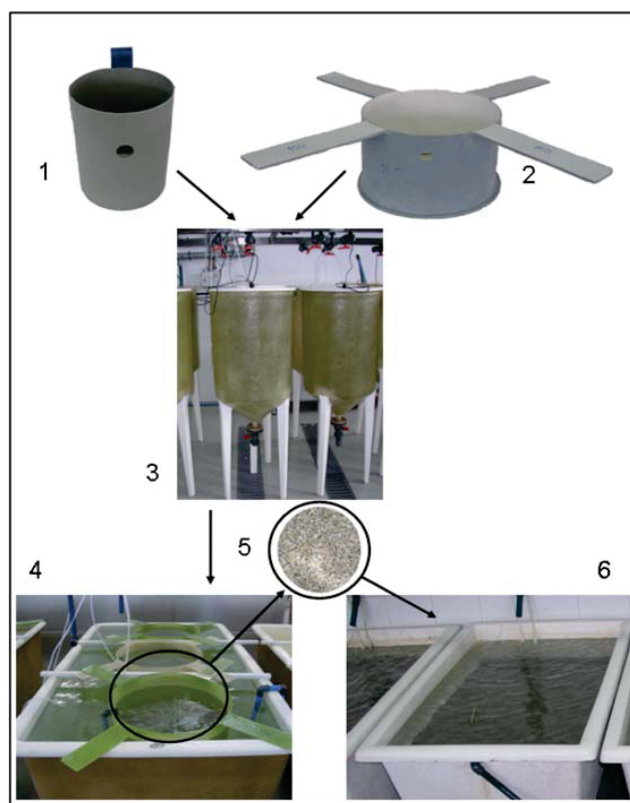


Figura 10. Sistema de cultivo de postlarvas y semilla en criadero. (1) Contenedor de 0,125 m². (2) Contenedor de 0,5 m². (3) Tanque troncocónico de 150 litros para el cultivo de postlarvas. (4) Tanque de 1000 litros para el cultivo de semilla en cilindros. (5) Vista ampliada de la semilla mantenida en este sistema. (6) Tanque de 200 litros con base de arena.

El longueirón vello (*S. marginatus*), al presentar la metamorfosis antes, puede alcanzar mayor longitud al mes de vida (1,7 mm) frente a las dos especies de *Ensis* que alcanzan 1 mm de longitud (Tabla IV) (Figs. 11 y 12). Es a partir del mes de vida cuando comienzan a alargarse y adquirir el aspecto característico de los adultos en las 3 especies (Figs. 13 y 14). Después de 120 días la mayor talla se alcanza en las 2 especies de *Ensis* con unos 30 mm, frente a *S. marginatus* que mide 20 mm. Los modelos de ajuste para el crecimiento en longitud y la relación longitud-peso muestran un ajuste exponencial en las tres especies y es *S. marginatus* la especie que presenta un mayor peso para la misma longitud, a partir de los 15 mm.

Tabla IV. Comparativa del cultivo en semillero.

| | Talla al mes | Talla a 4 meses | Peso a 4 meses |
|-------------------------|--------------|-----------------|----------------|
| <i>Ensis arcuatus</i> | 1 mm | 30 mm | 0,4-0,45 g |
| <i>Ensis siliqua</i> | 1 mm | 30 mm | 0,4-0,45 g |
| <i>Solen marginatus</i> | 1,5-2 mm | 20 mm | 0,35-0,4 g |

El crecimiento en altura de las 3 especies es similar durante todo el estudio, ajustándose a una ecuación potencial (Fig. 11). Por el contrario, el peso durante los primeros 120 días de cultivo es parecido en las especies estudiadas, y después en *E. arcuatus* el peso fresco total alcanzado es superior debido al mayor incremento en longitud (Fig. 12).

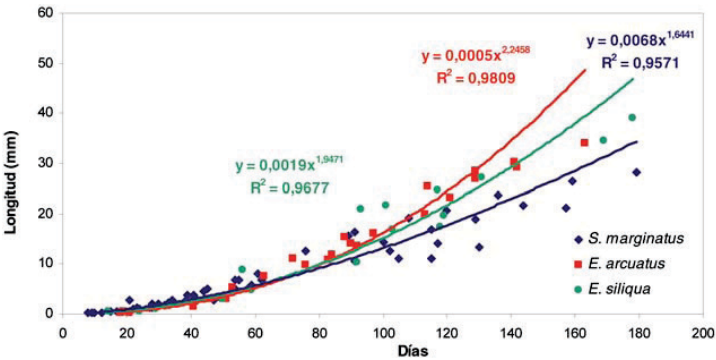


Figura 11. Crecimiento en longitud de las postlarvas y semilla.

Cultivo y artes de pesca

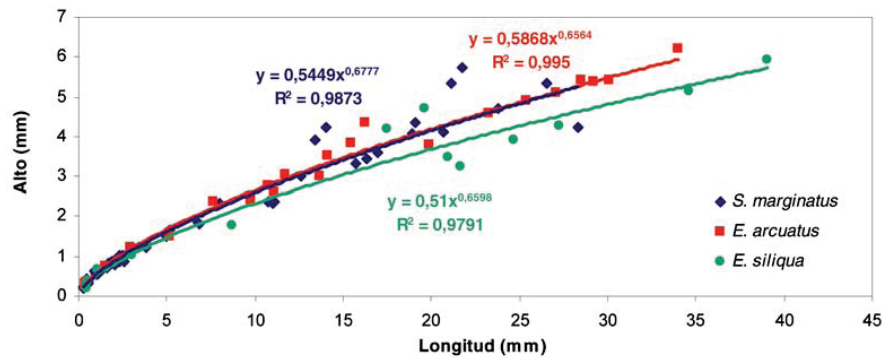


Figura 12. Relación longitud-alto en las tres especies de las postlarvas y semilla.

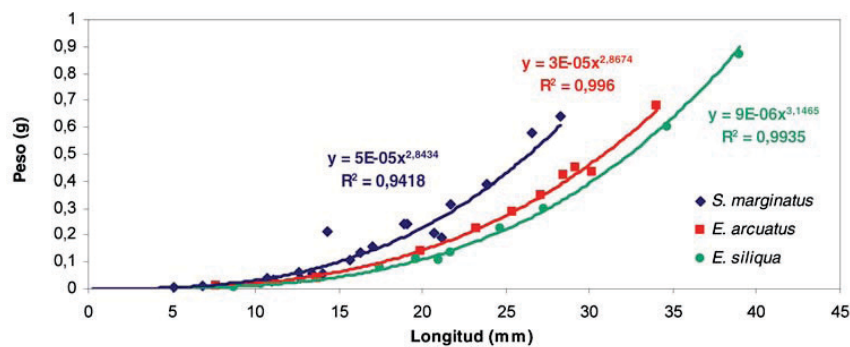


Figura 13. Relación longitud-peso en las tres especies de las postlarvas y semilla.

El cultivo de solénidos está limitado por la necesidad que tienen los individuos de estar enterrados en la arena y por ser sensibles a la manipulación, lo que dificulta el manejo y limpieza de la semilla. Se realizaron diversas experiencias en las que se probaron diferentes tamaños de contenedores para las postlarvas y el momento más adecuado en que se deben pasar al sustrato e incluso la viabilidad de los cultivos trabajando sin éste, analizando en cada experiencia los crecimientos y supervivencias obtenidas.

Para ello se usaron contenedores de área: 0,125 y 0,5 m² y se probaron distintos momentos para su traslado a la arena: en la fijación, al mes de vida (aproximadamente 1 mm de longitud) y en el momento de la siembra.

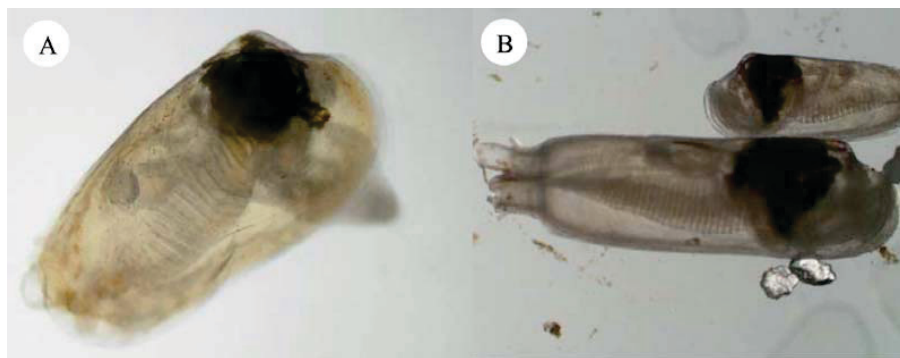


Figura 14. (A) Postlarva de 1 mes de *Ensifer*. (B) Postlarva de 1 mes de *S. marginatus*.

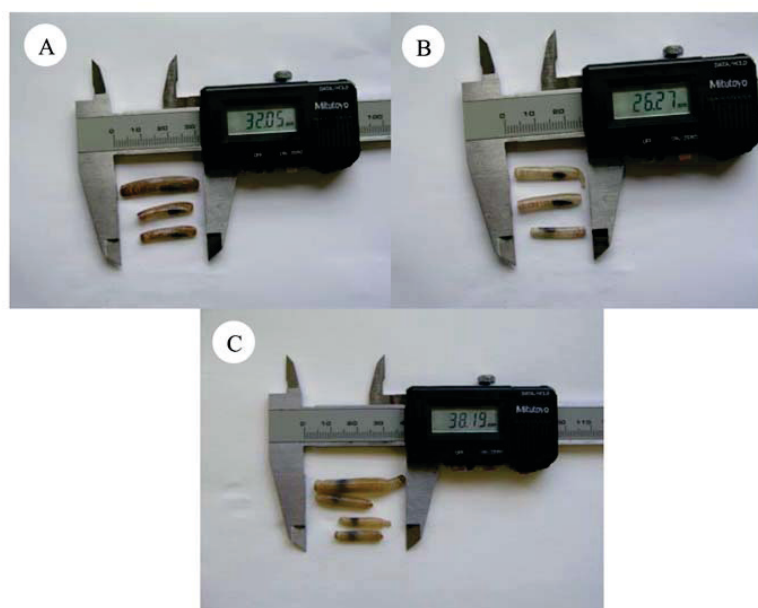


Figura 15. Semilla de *E. arcuatus* (A), *E. siliqua* (B) y *S. marginatus* (C).

Cultivo y artes de pesca

Los mejores resultados, hasta 1 mm en las 3 especies (1 mes de vida aproximadamente), se consiguen sin sustrato, lográndose la mayor supervivencia con recipientes de menor tamaño (0,125 m²), frente a los de mayor área donde las postlarvas están más dispersas.

Al alcanzar el mes de vida deben pasarse a recipientes de mayor superficie y con una fina capa de arena que irá aumentándose en función del crecimiento de los cultivos. La utilización de arena limita el manejo de grandes cantidades de semilla.

3. Cultivo en el medio natural

La semilla producida en criadero debe ser transferida al medio natural para continuar su crecimiento al alcanzar una talla adecuada (a partir de 10-15 mm). En el criadero las cantidades de alimento necesarias para su mantenimiento sobrepasan el límite de factibilidad técnica y económica, por lo que se debe seguir su evolución en el medio natural en un sistema adecuado a los requerimientos de estas especies.

Para poder realizar el seguimiento de la semilla sembrada se prepararon unos artefactos para enterrarlos en el sustrato. Las jaulas se han construido con varilla metálica de 10 mm de diámetro, con un área de 50 x 50 cm y altura de 50 cm; y rodeadas de una malla plástica (Fig. 16). Las jaulas enterradas en el sustrato se cubren en su parte superior por una malla plástica de luz de malla variable según el tamaño de los ejemplares, para evitar la fuga de los individuos. Estos artefactos se entierran en el sustrato arenoso de forma que la tapa quede a nivel del sustrato. Periódicamente se muestrean anotando longitud, altura, peso y supervivencia.



Figura 16. (A) Artefacto para el cultivo de semilla de solénidos en el medio natural. **(B)** Juveniles de *Solen marginatus*.

Para las experiencias con *S. marginatus* se ha utilizado semilla de $19,1\pm1,9$ mm de longitud y $0,24\pm0,09$ gr de peso medio (4 meses de vida). Al año de vida alcanzan una longitud de $38,5\pm3,9$ mm y un peso de $1,56\pm0,46$ gr, 8 meses después de la siembra (Fig. 17; Tabla V). A los 2 años miden $69,0\pm4,8$ mm de longitud y pesan $8,04\pm1,39$ gr. La supervivencia acumulada fue de 70-84%. La talla comercial se alcanzó a partir de los 3 años de vida, alcanzando $80,1\pm5,2$ mm de longitud. El crecimiento está influenciado por la época del año, habiendo incrementos de talla a partir de la primavera hasta la mitad del otoño, deteniéndose durante la última parte del otoño y el invierno, lo cual sugiere un efecto combinado de la temperatura y el alimento. Al final de la experiencia la supervivencia se mantuvo entre 50 y 83%.

Tabla V. Comparativa del cultivo hasta talla comercial.

| | Talla a 1 año | Peso a 1 año | Edad a talla comercial |
|-------------------------|-----------------------------|--------------|------------------------|
| <i>Ensis arcuatus</i> | 64,1±3,0 mm (criadero) | 5,3±1,0 g | > 2,5 años (100 mm) |
| <i>Solen marginatus</i> | 38,5±3,9 mm (medio natural) | 1,6±0,5 g | > 2,5 años (80 mm) |

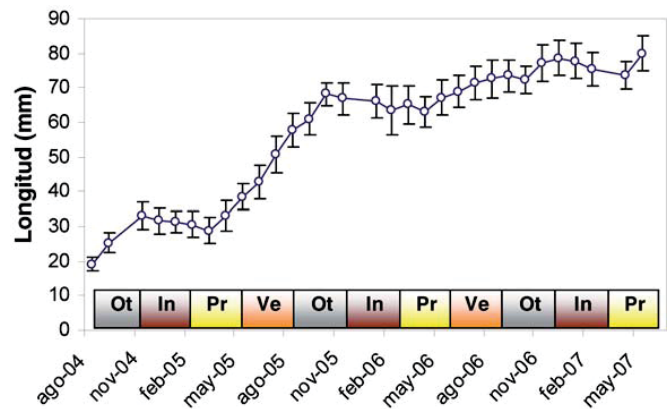


Figura 17. Crecimiento en longitud de la semilla de *S. marginatus* sembrada en recintos controlados en el medio natural. Se presentan las estaciones del año para mostrar el distinto crecimiento. Ot: Otoño; In: Invierno; Pr: Primavera; Ve: Verano.

Cultivo y artes de pesca

A lo largo del crecimiento de la semilla en criadero y medio natural la relación longitud-ancho en *S. marginatus* sigue una curva potencial, con una pendiente 0,7809 (Fig. 18). Según Gaspar (1996) este ajuste representa una relación alométrica negativa, puesto que el exponente se encuentra por debajo de la unidad, como sucede en *E. siliqua*.

La relación longitud-peso en la semilla de *S. marginatus* sigue un ajuste potencial de pendiente 3,008; por lo que se corresponde con una relación isométrica.

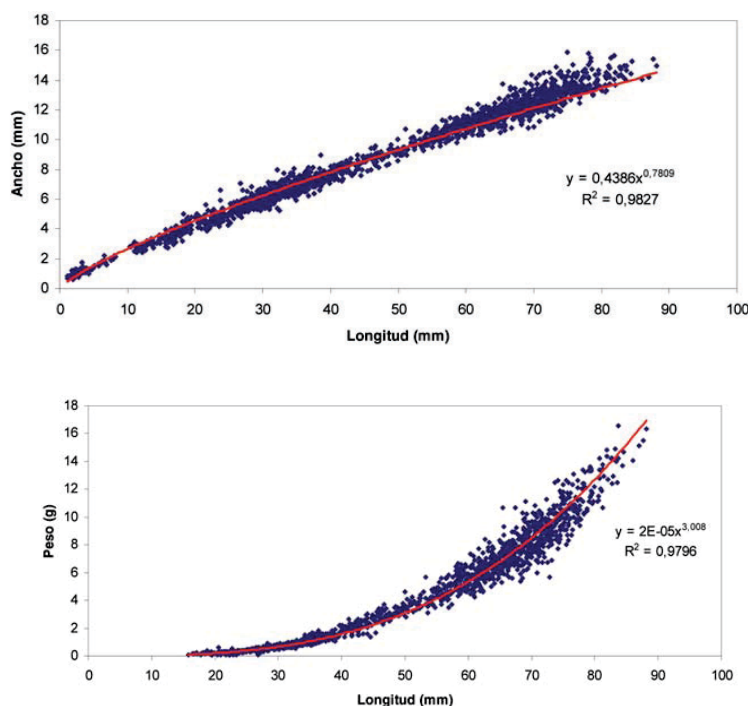


Figura 18. Relación longitud-ancho y longitud-peso en la semilla de *S. marginatus* sembrada en recintos controlados en el medio natural.

Con *E. arcuatus* se realizaron experiencias con juveniles de 1 año de edad provenientes de criadero y también del medio natural. Los ejemplares obtenidos en criadero median $64,1 \pm 3,0$ mm correspondientes a un peso de $5,3 \pm 1,0$ g. Se mantuvo la semilla hasta que las fuertes lluvias del siguiente invierno, con el consiguiente descenso brusco de la salinidad, causaron la muerte de la navaja. Hasta ese momento la supervivencia fue superior al 60% de los individuos de partida. El estudio permitió conocer que el crecimiento en longitud de la navaja sigue un modelo de ajuste de una curva exponencial, con una mayor dispersión de los datos a medida que avanzan los meses (Fig. 19). La relación talla-peso obtenida a partir de los individuos de *E. arcuatus*, mantenidos en criadero durante año y medio, sigue un modelo potencial (Fig. 20).

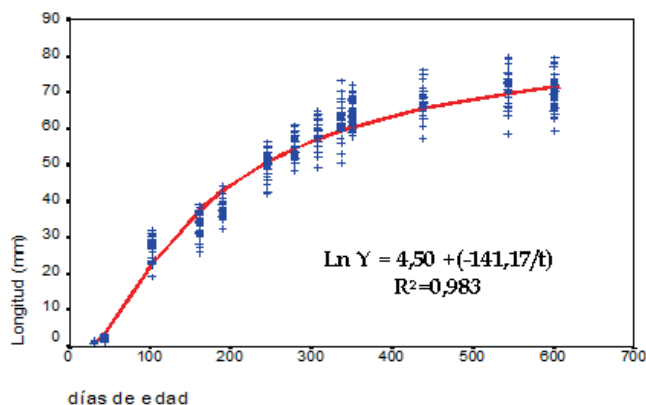


Figura 19. Crecimiento en talla de *E. arcuatus* obtenida en criadero. La longitud se expresa en mm y la edad en días tras la fertilización.

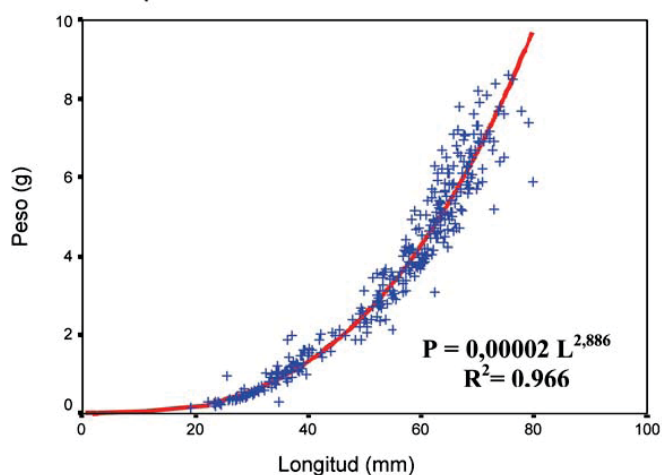


Figura 20. Relación talla-peso en *E. arcuatus* a partir de los parámetros biométricos de los individuos obtenidos en criadero y sembrados en el medio natural.

Para la determinación del crecimiento hasta talla comercial y la edad a la que se alcanza en *E. arcuatus* se ha experimentado disponiendo ejemplares de aproximadamente un año de edad ($65,0 \pm 7,7$ mm de longitud y $3,5 \pm 1,2$ g de peso). Los ejemplares se mantuvieron durante 18 meses aproximadamente. Un año después del traslado a las jaulas la longitud de los ejemplares era de $94,3 \pm 6,3$ mm y el peso

Cultivo y artes de pesca

13,2±2,1 g. Al final de la experiencia la talla alcanzada fue de 98,0±6,2 mm correspondiéndose con un peso medio de 14,7±2,2 g, muy próximo a la talla comercial de 100 mm para la especie. Se pudo observar como en primavera y verano había un crecimiento notable, y éste no se producía durante el otoño e invierno (Fig. 21). A los seis meses del traslado el 68,5% de los individuos sembrados permanecían vivos, a los doce meses la tasa de supervivencia se situó en el 56,8% de los individuos de partida.

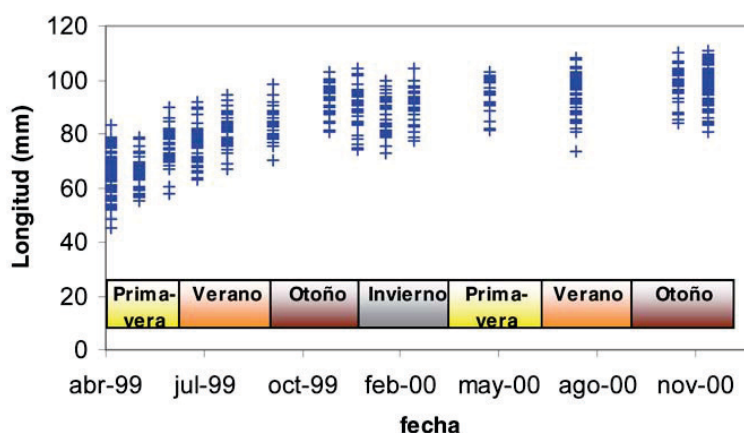


Figura 21. Crecimiento en talla de los individuos de *E. arcuatus* procedentes del medio natural y trasladados a recintos controlados en intermareal.

También, se realizaron experiencias de crecimiento de juveniles de 1 año de edad por subclases de talla con *E. arcuatus*. Las tallas de los ejemplares variaban entre 45 y 70 mm de longitud (Fig. 22). El crecimiento observado en las tres jaulas con tallas iniciales diferentes sigue una evolución similar a lo largo de los meses de estudio. Además se observan mayores tasas de crecimiento en las tallas más bajas de modo que se produce un acercamiento en las medias de cada jaula. La supervivencia tras año y medio de experiencia fue superior al 60%.

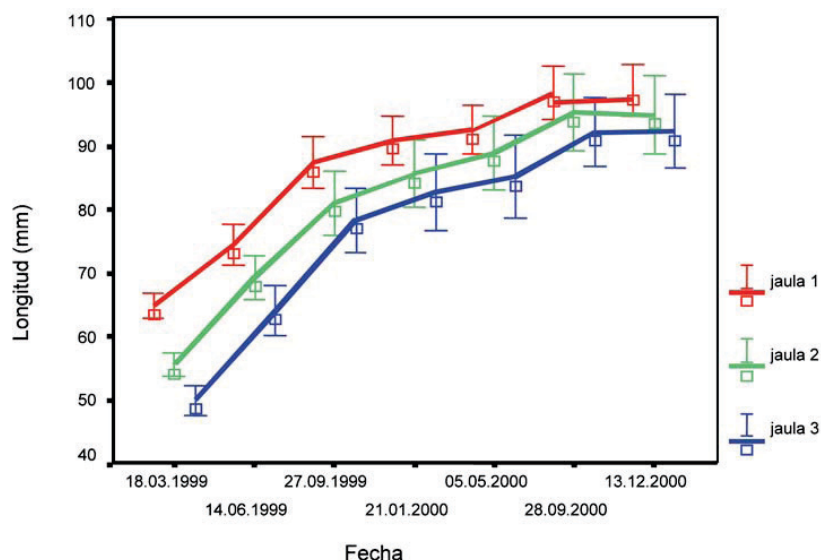


Figura 22. Crecimiento en talla de los ejemplares de *E. arcuatus* procedentes del medio natural y trasladados a recintos controlados en intermareal y clasificados por tallas.

4. Perspectivas del cultivo

El cultivo en criadero y medio exterior de estas tres especies de solénidos comercializadas en Galicia presenta puntos fuertes y debilidades.

Así, el acondicionamiento de reproductores es factible, pero por el momento el periodo en que se pueden obtener puestas a lo largo del año es reducido. Se deberían hacer esfuerzos en investigación en este aspecto, estudiando factores que afectan al ciclo reproductivo.

Los métodos de inducción a la puesta son satisfactorios en las tres especies, pudiendo mejorar el de *Solen marginatus*, para un mejor control en la obtención de ovocitos.

Estas especies no presentan problemas importantes en el cultivo larvario, si bien, la supervivencia larvaria en *Ensis arcuatus* es baja en relación con las otras dos especies.

El cuello de botella en el cultivo de estas especies es el cultivo de postlarvas y semilla. En la talla de 1 mm la supervivencia es muy baja, reduciendo mucho el rendimiento del cultivo. Además, la necesidad de sustrato a partir de una determinada

Cultivo y artes de pesca

talla, hace que el manejo sea costoso. Es la fase del cultivo que necesita un mayor desarrollo.

El cultivo exterior presenta buenas tasas de crecimiento y supervivencia, si bien, se debe minimizar el efecto de las épocas en que los crecimientos son limitados o nulos mediante la siembra en el momento más adecuado.

Agradecimientos

Este trabajo se desarrolló en el Centro de Cultivos de Ribadeo, CIMA, de la Consellería de Pesca e Asuntos Marítimos con la colaboración del personal y en el marco de los siguientes proyectos de investigación: "Cultivo de moluscos bivalvos de interés comercial", financiado por la Consellería de Pesca y Asuntos Marítimos; "Cultivo y gestión de solénidos" financiado por JACUMAR y el proyecto SHARE "Sustainable Harvest of Eusis", programa INTERREG IIIB.

Bibliografía

- Breese, W. P. ; Robinson, A. 1981. Razor clams, *Siliqua patula* (Dixon): Gonadal development, induced spawning and larval rearing. *Aquaculture*. 22: 27-33.
- Costello, D. P.; Henley, C. 1971. Methods for obtaining and handling marine eggs and embryos. *Woods Hole, MA: Marine Biological Laboratory*. 247 pp.
- Darriba, S. 2001. Biología de la navaja (*Ensis arcuatus* Jeffreys, 1865) de la Ría de Vigo (N.O. de España): Crecimiento y reproducción. *Tesis doctoral. Universidad de Vigo*. 283 pp.
- Darriba, S.; San Juan, F.; Guerra, A. 2004. Reproductive cycle of the razor clam *Ensis arcuatus* (Jeffreys, 1865) in northwest Spain and its relation to environmental conditions. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 311: 101-115.
- Darriba, S.; San Juan, F.; Guerra, A. 2005. Gametogenic cycle of *Ensis siliqua* (Linnaeus, 1758) in the Ría de Corcubión, Northwest Spain. *J. Moll. Stud.* 71: 47-51.
- Freudendahl, A. S.; Nielsen, M. M. 2005. Initial investigations on seed production of the American razor clam. *Workshop Internacional. Estado Actual de la Biología y Cultivo de Bivalvos Enterradores*. Concepción, Chile, 19-20 Abril.
- Gaspar, M. B. 1996. Bivalves do Litoral Oceânico Algarvio. Aspectos da biologia, ecologia e da pesca dos mananciais de interesse económico: aplicação à gestão dos recursos. *Tesis doctoral. Faro*. 282 pp.

- Guerra, A. 1979. Producción de semilla de ostra y almeja en la planta de cultivos marinos de Ribadeo. *Cuad. Marisq.* 14 pp.
- Leavitt, D.; Burt, W.; Murphy, D.; Hanson, R. 2002. Progress with culturing the razor clam (*Ensis directus*). *J. Shellfish Res.* 21 [1]: 345-346.
- Leavitt, D.; Gardner, J.; Getchis, T.; Grunden, D.; Murphy, D.; O'Connell, J.; Patricio, M.; Surier, A.; Warsworth, J.; Burt, W. 2005. A preliminary investigation of the razor clam (*Ensis directus*) as a candidate for commercial farming. *J. Shellfish Res.* 24 [2]: 663.
- Lépez, I. 2006. El cultivo de la navaja chilena *Ensis macha*. *VIII Foro dos Recursos Mariños e da Acuicultura das Rías Galegas.* 347-349.
- Loosanoff, V.; Davies, H. C. 1963. Rearing of bivalve larvae. *Adv. Mar. Biol.* 1: 1-136.
- Madrones-Ladja, J. A. 1997. Notes on the induced spawning, embryonic and larval development of the window-pane shell, *Placuna placenta* (Linnaeus, 1758), in the laboratory. *Aquat.* 157: 137-146.
- Martínez, D. 2002. Estudio de los Solénidos, *Solen marginatus* (Pennánt, 1777) y *Ensis siliqua* (Linné, 1758), de los bancos naturales de la Ría de Ortigueira y Ría del Barquero: ciclo gametogénico, composición bioquímica y cultivo larvario. *Tesis doctoral. Universidad de Santiago de Compostela.* 240 pp.
- Sullivan, C. M. 1948. Bivalve larvae of Malpeque Bay, P. E. I. *Bull. Fish. Res. Bd., Canada.* 77: 1-36.
- Walne, P. R. 1966. Experiments in the large-scale culture of the larvae *Ostrea edulis* L. *J. Shellfish Res.* 25 [4]. *Ser. 2. Ministry of Agriculture, Fishery and Food.* 53 pp.